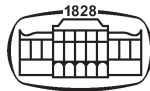


A NÖVÉNYEK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJÁTÓL
A ZÖLD BIOTECHNOLÓGIÁIG

A NÖVÉNYEK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIÁJÁTÓL A ZÖLD BIOTECHNOLÓGIÁIG

Dudits Dénes akadémikus 70. születésnapjára

Szerkesztette
Fehér Attila



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



A kiadvány megjelenését a Magyar Tudományos Akadémia támogatta

ISBN 978 963 05 9537 7

Kiadja az Akadémiai Kiadó,
az 1795-ben alapított
Magyar Könyvkiadók és Könyvterjesztők Egyesülésének tagja
1117 Budapest, Prielle Kornélia u. 21–35.
www.akademiaikiado.hu

Első magyar nyelvű kiadás: 2014

© Fehér Attila szerk., 2014

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános előadás,
a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát,
az egyes fejezeteket illetően is.

Printed in Hungary

Tartalom

Fehér Attila: A szerkesztő ajánlása	7
I. Chikán Ágnes: Egy „hibridember” hetven éve	9
II. Koncz Csaba: A molekuláris módszereken alapuló növénynemesítés története az öröklődés szabályainak megismerésétől a genomikáig	22
1. Az öröklődés szabályainak megismerése és a növénynemesítés genetikai alapjai.	22
2. A molekuláris biológia története a transzformációtól a genetikai mérnökségig	48
3. A molekuláris növénybiológia mérföldkövei a szövettenyésztéstől a genominformatikai robbanásig.	80
III. Fehér Attila: Kicsi a ROP, de erős! A növényi kis molekulatömegű ROP GTPázok mint jelátviteli kapcsolók.	128
IV. Mészáros Tamás: Fehérjesszintézis kémcsőben, avagy az in vitro transzláció alkalmazási lehetőségei.	154
V. Magyar Zoltán: Onkogének és tumorszupresszorok a növényekben: az E2F-RB szabályozási mechanizmus szerepe	168
VI. Szabados László: A szárazság- és sótűrés szabályozása a virágos növényekben	192
VII. Horváth Gábor: A növények stressztűrő képességének növelése génbeépítéssel	212
VIII. Mórocz Sándor: Visszatekintő a tengeri szegedi szövettenyésztéséről	226
IX. Dudits Dénes: Honnan hová tart a zöld agrár-biotechnológia Magyarországon?.	240



„Hibridember vagyok: benne élek a legizgalmasabb növény-élettudományi kutatások világában,
de a mezőgazdaság aktuális kérdéseit is figyelemmel kísérem.”

A szerkesztő ajánlása

A növények az evolúció sajátos útját járják. A napfény energiáját felhasználva a légköri szén-dioxidból és a talajból felvett vízből, valamint az abban oldott anyagokból táplálkoznak, amihez helyhez kötött életmód társul. Mindez megköveteli tőlük a változó környezeti feltételekhez való folyamatos alkalmazkodást. Dudits Dénes akadémikus mintegy fél évszázados kutatói munkásságának középpontjában mindvégig a növényi egyedfejlődés rugalmasságának háttérében álló molekuláris genetikai folyamatok és azok biotechnológiai alkalmazásának lehetőségei álltak és állnak ma is. Ez alatt a nagyjából ötven év alatt ez a kutatási terület hatalmas változásokon ment át: ekkor vált lehetővé a növényi sejtek fúziója, a növényi gének izolálása, a növények genetikai transzformációja, a géntechnológiai módszerek biotechnológiai alkalmazása, a teljes növényi genomok megismerése, hogy csak a legfontosabbakat említsük. Ebben a kötetben Dudits Dénes 70. születésnapja alkalmából néhány korábbi munkatársa, tanítványa, és maga az ünnepelt arra vállalkoztak, hogy felvázolják a modern növénybiológia és biotechnológia nemzetközi és hazai történetének legfontosabb eseményeit, jövőbeni lehetőségeit, és emellett egy keresztmetszetet adjanak jelenlegi tevékenységükről is. Ennek a komplex célkitűzésnek a következtében az egyes fejezetek jellege rendkívül változatos, de reményeink szerint a „duditsi” szemlélet, a növénybiológia és biotechnológia fontosságába vetett hit, egységbe kovácsolja azokat.

Chikán Ágnesnek a 70 éves Dudits Dénessel készített interjúja vezeti be a kötetet, melyből feltáru előttünk az ünnepelt életútja és szakmai, tudománypolitikai szemlélete. Ezt követi Koncz Csabának, a kölni Max Planck Növénynevelési Kutatóintézet egyik vezető kutatójának három rendkívül igényes tudománytörténeti fejezete, amely az öröklődés szabályainak kezdeti felismerésétől a genomikai forradalomig követi nyomon a modern növénybiológia kialakulását, beágyazva a genetika és a molekuláris biológia fejlődéstörténetébe. A fejezeteket olvasva méltán tölthet el minket büszkeséggel, hogy hány kiváló magyar tudós, illetve kutató játszott jelentős szerepet ebben a történetben. Ezek a fejezetek ugyanakkor kiválóan összefoglalják azokat a tudományos ismereteket is, amelyek elvezettek a géntechnológiai úton módosított organizmusok (GMO-k) megjelenéséig, és amelyek bizonyítják számos, a genetikai módosítással szembeni kritika és félelem megalapozatlanságát. Ezt követően a „Dudits-iskola” korábbi növendékei (Fehér Attila, Mészáros Tamás, Magyar Zoltán, Szabados László, Horváth Gábor) villantanak fel egy-egy szűkebb tudományterületet, amelyet jelenleg művelnek, betekintést adva ezzel a növénybiológiai kutatások

jelenébe. Mórocz Sándor, kukoricanemesítő, a Dudits Dénessel közösen kidolgozott, jelentős biotechnológiai alkalmazásokat megalapozó és nemzetközi sikerű kukorica-genetikai transzformációs rendszer történetét meséli el. A könyv zárásaként Dudits Dénes maga tekinti át a hazai növény-biotechnológia múltját, eddigi eredményeit és lehetőségeit, egyebek mellett a géntechnológiai módszerekkel nemesített növények körül kialakult vita tükrében.

A kötetet ajánljuk mindazoknak, akik szeretnék megismerni vagy hallgatóikkal megismertetni a molekuláris növénytudományok és a növényi biotechnológia nemzetközi és hazai történetét, szeretnék bővíteni növényi molekuláris biológiai és biotechnológiai ismereteiket, vagy tájékozódni kívánnak a növények géntechnológiai úton történő nemesítésével kapcsolatban felmerült kérdésekről. Nem utolsósorban ajánljuk a könyvet azoknak, akik betekintést kívánnak nyerni Dudits Dénes akadémikus munkásságába, akinek ezúton is kívánunk 70. születésnapja alkalmából jó egészséget és hosszú, további sikerekben gazdag életet! Isten éltesse sokáig!

Fehér Attila

I. Egy „hibridember” hetven éve

(CHIKÁN ÁGNES INTERJÚJA DUDITS DÉNESSEL)

Dudits Dénes, a laboratórium zárt világában szorgoskodó, nemzetközileg is elismert eredményeket elérő kutató neve a köztudatban akkor vált ismertté, amikor az ország legnagyobb élettudományi kutatóközpontjának, az MTA Szegedi Biológiai Központnak a főigazgatója lett. Tizenhárom évig irányította az ott folyó munkát, melynek eredményeként ezt az időszakot másodvirágzásként jegyzi a 40 éves, az EU Kiválósági Központja minősítését elnyert intézmény krónikája. A 70 esztendő, Széchenyi-díjas akadémikus egyéni kutatói pályája a vezetői teendők mellett is töretlenül, egyenesen ívelt fölfelé, irányító, szervező tapasztalatait 2008-tól, a köztestületi tagok bizalmának jóvoltából, az MTA alelnökeként is igyekezett hasznosítani. Mindemellett maradt ereje, kitartása és bátorsága arra, hogy mindenféle szakmai, politikai ellenszéllel szemben kiálljon tudományosan megalapozott meggyőződése, a GMO-k létjogosultsága mellett, vállalva a saját presztízsét veszélyeztető harci sebeket is. Az SZBK-ban emeritusz professzorként tovább dolgozó tudóssal életpályájáról beszélgettem.

– *Agrármérnökként a kutatási szakterülete a növényi molekuláris és sejtbiológia, az agrár-biotechnológia. Ha fölteszem az ilyenkor szokásos kérdést: mi készítette rá, hogy ezt a pályát válassza, meglepődnék, ha azt felelné: kora gyermekkorra óta erre készült.*

– Márpedig ebben sok igazság van. Mindnyájunk életében az ősöktől örökölt gének és a szülői minták a meghatározóak, ezt nevezhetjük családi háttérnek. Mosonmagyaróváron születtem, ott, ahol a Magyar Királyi Gazdasági Akadémia működött. Édesapám, Dr. Dudits Dénes mint okleveles közgazdász, Groffits Gábor igazgató titkáráként lett egy életre szóló elkötelezettje ennek az óvári intézménynek. Érzelmi ragaszkodása és szakmai elhivatottsága készítette a második diploma megszerzésére, miután okleveles gazdaként végezhetette oktatói munkáját. A mezőgazdasági és közgazdasági tudományok integrálása révén újszerű szemlélettel foglalkozott a gazdaságtörténettel és az üzemi tanácsadással. Édesapám kutató, kísérletező polihisztorként sokféle tudomány iránt érdeklődött. Széles nyelvtudása segítette az ismeretszerzésben, gyakran láttuk, amint a könyvtári kölcsönkönyveket jegyzetelte. Épített szélmotort, a lakásunkban saját kémiai laboratóriumot rendezett be. Kertészkedő emberként mestere volt a növények nevelésének. Édesanyám tanítónőként Óváron különböző iskolákban dolgozott. Az életvidám asszony energikus, szervező egyéniségként aktív tagja volt a tanári karnak, társaságoknak. Szüleink tulajdonsá-

gait mi, gyerekek más-más kombinációban örököltük. Az agrár-felsőoktatás épületeinek környezetében élő kisgyerekként eszméltem a világra, és hatott rám a két szülő eltérő egyénisége.

– *A 40-es évek végét, az 50-es éveket a legtöbb család megszenvedte. Tudtommal az idő tájt a Gazdasági Akadémia jogutódja is bezárta kapuit, Mosonmagyaróvár neve pedig később még tragikusabb események emlékét idézte föl. Hogyan érintette mindez az önök életét?*

– A család történetének lényeges dátuma 1949, amikor bezárták az Agrártudományi Egyetem összes vidéki osztályát, így a magyaróvárit is. Nyilván politikai szempontokat is figyelembe véve, a professzori karból csak a kiválasztottak kaptak állást a Gödöllői Agrártudományi Egyetemen. Édesapámat egyetemi intézeti tanárként 37 évesen nyugdíjazták. Végül aztán egy állami gazdaságban építésvezető agronómusként alkalmazták.

– *Az akkori kisgyerek számára tehát megszűnt az a paradicsominak tűnő környezet, ám magam is emlékszem rá, óvodásként akkor nem érintett meg különösképpen a félelem légköre, a szüleink generációját azonban, ha nem is beszéltek róla előttünk, komoly lelki és egzisztenciális gondok nyomasztották. Önben milyen nyomot hagyott ez az aggodalommal teli időszak?*

– A költözés izgalmas élmény egy gyerek számára. A bajokat nem érzékeltem, sőt úgy tűnt, hogy a mi családunkat kárpótolja a sors: az időközben megszületett Judit kishúgommal együtt, akiből fizika-kémia szakos tanár lett, az egyetem vári épületének lakói lettünk. Ugyanis 1954-ben újra megnyitották a korábban bezárt vidéki agrár-felsőoktatási intézményeket, és édesapám elsőként kapott vezetői megbízást, hogy gazdasági igazgatóhelyettesi beosztásban hozza működésbe az óvári alma matert. Beköltöztünk a vár második emeleti lakásába, a nagymamámé lett a toronyszoba, amely ugyancsak megmozgatta gyermeki fantáziánkat, hiszen úgy tudtuk, ott raboskodott Mátyás király. Ott nőttünk föl a spirituszban preparált állatok között, bejártuk a tantermeket, játszottunk a lucsonyi Országos Növénynevelési Intézet kísérleti telepén. Tízévesen már láttam edényekben nevelt búzánövényekkel végzett kísérleteket.

– *Talán ez is lépéselőnyt jelentett az ön számára később, a többi, biológia iránt érdeklődő társa között. Visszatekintve a kezdetekre, bizonyára nem túlzás azt állítani, hogy életre szóló hatást gyakorolt az egyetem világa a nyiladozó értelmű kisgyerek számára. Ez a varázslat azonban nem tartott sokáig. Utólag talán hálát adhattak Istennek, mert ezek szerint édesapja nem volt ott a sok áldozatot követelő '56-os sortűznél.*

– Édesapám szakmai lelkesedése és szervezői buzgalma hamarosan politikai és személyi érdekekbe ütközött, és megbízatásának feladására kényszerült. Tervezési szakemberként kapott állást az Állami Gazdaságok Minisztériuma Győr Megyei Igazgatóságán, ezért Győrbe költöztünk. Bizony, visszatekintve a gondviselés jelének te-

kintjük ezt az elköltözést, hiszen így egy családi tragédiát kerültünk el. Ha Óváron maradunk, édesapám is kint lett volna az utcán a diákokkal, akikre az ávósok löni kezdtek. De ha semmit nem tett volna, akkor is bajba kerül, hiszen a forradalom leverése után az egyetem vezetőit bebörtönözték. Már Győrben laktunk, amikor megszületett Gábor öcsém. Benne az őseink génjeinek érdekes, egyedi kombinációja alakult ki. Már gyerekkorában szeretett csereberélni, adni-venni, és felnőttként sikeres üzletember lett. Egy vendéglátó cégbirodalmat alapított, amelyet most a gyermekei üzemeltetnek.

– *Életük tehát Győrben folytatódott, iskoláit is itt végezte professzor úr. Jó tanuló volt, hamar kitűnt a többiek közül?*

– Általános iskolában nem különösképpen, átlagos teljesítményt nyújtottam. A fordulat a gimnázium első osztályában következett be, meglepetésre az osztályelső közé kerültem. Egy furcsa pedagógusi taktika szerint nálunk a négy év alatt csak jeles bizonyítványt lehetett kapni. Az érettségi számomra már természetesen kitűnő minősítéssel végződött. Érdeemes megemlítenem, hogy az én időmben a Révai Miklós Gimnáziumban politechnikai osztályok is voltak. Én lakatos szakmát tanultam, ami azt jelentette, hogy hetente egy napon, illetve a nyári szünetben egy hónapig a Magyar Vagon- és Gépgyár műhelyében dolgoztunk. A reggel hat órai munkakezdés emléke még most is él. Visszaidézem azt, amikor dízelmozdonyokat hegesztettünk. Végül is nem tettem le a szakmunkásvizsgát, mert felvettek a Gödöllői Agrártudományi Egyetemre. A vagongyári tapasztalatok biztosan segítettek abban, hogy a mezőgazdaság felé vettem az irányt.

– *Érdeklődése ekkor fordult tudatosabban a növények felé? Kinek, minek volt szerepe abban, hogy vonzalma csak egyre fokozódott a kutatás, a biológia iránt?*

– Ismét édesapámat kell említenem, aki elvárta, hogy segítsek a kertészkedésben. A család szerény anyagi helyzetén javított a piacolás, amikor a bérelt kertben termesztett virágokat árultuk. Apám átgondolt felkészítő szándékának köszönhettem azt is, hogy gimnazista diákként a nyári szünetben, a fertődi kastélyban, a Fertődi Kutató Intézetben a Kossuth-díjas búzanemesítő, Beke Ferenc (1914–1988) mellett dolgozhattam. Ott végeztem az első kísérleteimet. Beke Ferenc elmagyarázta, hogy milyen fontos szerepe van a gyökérzetnek a búza életében. Azzal bízott meg, hogy a tenyészedényekben nevelt búzák gyökereit mossam ki, és a fajtákat gyökérméret szerint szelektáljam. Az intézetben ismertem meg Garay András (1926–2005) és Sági Ferencet (1927–2006), a növényélettan kutatóit. Itt tanultam meg, hogyan kell megfesteni a növények kromoszómáit, Zatykó József nagyra becsült későbbi barátom pedig a poliploid növények előnyeiről beszélt nekem. Hadd említsem meg, hogy most, pályám vége felé az egyik fő kutatási témánk azzal foglalkozik, hogy egy gyökérfenotipizáló automatát építünk, amelynek segítségével digitális képeket készítünk az átlátszó plexihengerben nevelt búzák gyökeréről. Emellett egy nagy kutatási projektet vezetek, amelyben az energiafűz poliploid változatát állítottuk elő azért, mert ezek a nö-

vények várhatóan nagyobb biomasszahozamot produkálnak, mint a normál, diploid változatok. Az rejtély, miért térnek vissza a kezdetek témái.

– *Mintha a sors kifejezetten erre a pályára teregette volna. Az egyetemi évek alatt is professzor úr mellé pártolt a szerencse? Akadt olyan tanítómestere, aki különös figyelemmel segítette a tanulmányai során?*

– Elsőévesként szeptemberben bementem az egyetem könyvtárába, s kikértem néhány genetikai könyvet. A könyvtárost ez annyira meglepte, hogy följánlotta, bemutat a férjének, Füredi Jánosnak (1926–1989), aki adjunktus a Genetika Növény-nemesítési Tanszéken. Ő lett a konzulensem, s ősszel már búzakísérletet vetettem a kísérleti telepen, Császár Jenő hallgatóhoz csatlakozva, aki később a jarovizációt kutatta az MTA Mezőgazdasági Kutató Intézetében, Martonvásáron.

– *Ez volt professzor úr második találkozása a búzakutatással, mert, ahogy tudom, vissza-visszatérő témát adott önnek ez a növény.*

– Diákkörösként végig dolgoztam az egyetemi éveim alatt, és miután a búzaku-tatást abbahagytam, a borsó mutációs genetikájával kezdtem foglalkozni. 1962-ben kapcsolódtam be a Genetika és Növény-nemesítés Tanszék életébe, amelynek vezetője Bálint Andor (1920–2006) professzor volt. Magyarországon ezekre az évekre esett a genetikában a mendeli öröklődés tételeihez való hivatalos visszatérés, de a tanszé-ken még a micsurini-liszenkói irányzat szellemében folytatták a kutatásokat. A ve-getatív hibridizációt paradicsom + paprika oltványokon tanulmányozták. Maga T. D. Liszenko (1898–1976) járt az egyetemen, hallottam is az előadását. Tanainak egyik alaptétele, hogy megváltozott külső környezeti hatásokra a szerzett tulajdonságok bizonyos feltételek mellett öröklődnek. Ilyen például az őszi búzák tavaszivá alakí-tása hőhatással. A tanszéken a klasszikus genetikai génkutatás előtérbe kerülésének egyik megnyilvánulása az volt, hogy a besugárzással vagy a kémiai mutagénekkel ki-váltott öröklődő megváltozások, a mutációk tanulmányozása előtérbe került mind a kukorica, mind a borsó esetében. Ehhez nekem is alkalmazkodnom kellett a diákköri, majd az egyetemi doktori és kandidátusi téma kiválasztásánál. Amikor elutasítjuk a micsurini-liszenkói irányzat szélsőségeit, nem hallgathatjuk el, hogy a tudomány legújabb eredményei több területen is az akkori felvetéseket látszanak igazolni, bár nyilvánvalóan egészen más kísérleti rendszerekben, magas színvonalú tudományos megközelítések alapján. Természetesen mélyen elítélem azt, hogy a politika a hatal-mával visszaélve tudományos kérdésekben intézkedik, amivel nagy károkat okoz a tudomáynak, sőt ideológiai alapon ártatlan tudósokat is ellehetetlenít. Az ivaros folyamatokat megkerülő hibridizáció lehetőségéhez visszatérve, beigazolódt, hogy a sejtfal nélküli sejtek, a protoplasztok egybeolvasztásával, fúziójával lehet valóban szomatikus hibrideket létrehozni. Sőt, az oltást követően a genetikai információ hordozó molekulák, akár a sejtorganellumok is kicserélődhetnek az alany és az olt-vány között. Ami a szerzett tulajdonságok öröklődését illeti, mára már ismert az epi-genetikus tényezők szerepe az öröklődésben, amikor nem a gén, annak DNS-szek-vencia-sorrendje hordozza az információt, hanem a kromatin szerkezetét kialakító

mechanizmusok, amelyek környezeti hatásokra jönnek létre, és több generáción keresztül megőrződnek.

– *Ez is újabb fordulat volt az életében, amely évekre meghatározta a munkájának irányát...*

– ...és itt említem meg, hogy a borsókísérleteknek köszönhetem életem másik nagy ajándékát: itt ismertem meg Molnár Juditot, későbbi feleségemet, akit laboránsként osztottak be mellém a borsómutációs munka elvégzéséhez. Fiatalon, '68-ban össze is házasodtunk. Az ő családjának szellemisége, életvitele is nagy hatással volt rám, s egész további életemre. Ha visszatekintek közös életünk 46 évére, az együtt elért sikereinkre, biztosan felismerhető annak szerepe, hogy Jutka engem mint laboratóriumi munkást is közelről megismert. Feleségként nem jelentett meglepetést számára az estébe nyúló kísérletezés, az éppen aktuális problémákra való szüntelen koncentráció. De vissza a borsóhoz: akkor úgy éreztem, kényszerpályán mozgok, de mint az évek során bebizonyosodott, tudományos érdeklődésem középpontjában a mai napig az áll, hogy miként lehet a gének szerepét megismerni, a működésüket megváltoztatni, a növényi genomot mind nagyobb precizitással úgy szerkeszteni, hogy a növények egyre inkább megfeleljenek az emberi igényeknek.

– *Ezután következett egy rövid, de jelentős külföldi kitérő az árpakísérletekkel. Ez is kényszerpálya volt?*

– Nem, ez egy lehetőség volt arra, hogy betekinthessek a színvonalas nemzetközi kutatómunka műhelytitkaiba. Ezt is Bálint Andor professzor támogatásának köszönhetem, aki egy ismeretsége révén elintézte, hogy még egyetemistaként kiutazhattam nyári gyakorlatra az NDK-ba. Abban az időben Gatersleben volt a szocialista országok növénykutatói számára a csúcs, a legmodernebb kutatóintézet. A Kaiser Wilhelm Institute of Crop Plant Research alapító igazgatója, Prof. Hans Stubbe (1902–1989) személyesen fogadott, ez a rendkívüli találkozás egy egyetemista számára igen emlékezetes maradt. Feladatként azt kaptam, hogy vegyek részt az árpamutáns-gyűjtemény kísérleti parcelláinak aratásában. Zöldfülű diákként nyolc-tíz német asszony munkáját irányítottam. A laboratóriumi munka során új citológiai módszereket tanulhattam meg. Egy kölcsönkapott biciklivel többször elkerekeztem a közeli Quedlinburgba, a Harz-hegységbe. Ma a gaterslebeni intézet még mindig igen fontos szereplő a növénytudományok frontvonalában. Az IPK-val (Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) az elmúlt években volt egy közös német–magyar kutatási együttműködésünk, és izgalommal látogattam vissza diákéveim fontos laboratóriumaiba.

– *Tudom, vörös diplomával végzett az egyetemen, s 1970-ben megszületett első gyermekük Gödöllőn. Pályakezdés, családalapítás. Hogyan emlékezik vissza minderre?*

– Boldogok voltunk, de a körülmények, különösen lányunk megszületése után, aggasztottak bennünket. Egy penészes vályogházban laktunk, fürdőszoba nélkül, illemhely az udvarban... S akkor ismét felénk nyúlt egy segítő kéz. Láng István, aki Straub F. Brunó (1914–1996) mellett a Szegedi Biológiai Központ (SZBK) megszer-

vezését irányította, tehetséges fiatalokat keresett az egyetemeken, intézetekben, hogy legyen kikkel elindítani a központ munkáját. Bálint Andor engem ajánlott. Nem volt kérdés, hogy megyünk, különösen nem, amikor megtudtuk, hogy lakást is kaphatunk. Így kerültünk 1971-ben Szegedre, ahol feleségem magyar–oroszl tanári diplomát szerzett, és ott született meg még két gyermekünk, két fiú. Dudits Dénes szociális munkás és sikeres a szenvedélybetegek gyógyításában. Dr. Dudits András angol diplomát szerzett, és a Szegedi Egyetem Angol Tanszékén adjunktus, kutatási területe „A fordítói olvasás kognitív és gyakorlati mechanizmusai”. Elsőszülött lányunk, Dudits Katalin angol–olasz szakos tanár, és Szegeden, a Radnóti Miklós Gimnáziumban tanít.

– *Emlékszem, egyszer büszkén említette, hogy ön az SZBK neveltje, aki ott járta végig a ranglétra minden fokát, a kezdő munkatársi státusztól egészen a főigazgatói „csúcsig”.*

– Valóban. Szeged új fejezetet nyitott a kutatói pályámon, és egész további sorsomat meghatározta. Az Alföldi Lajos által vezetett Genetikai Intézetbe kerültem, ahol a kandidátusi disszertációm a gödöllői borsómutációs témából írtam és védtem meg. A politika azonban elvárta az SZBK-tól, hogy a Házban legyen búzakutatás, és hát Alföldi Lajos többszöri felszólításához ajánlatos volt alkalmazkodnom, így ismét búzakutató lettem, bár egészen más irányból. A 70-es évek elején kezdett világszerte kibontakozni a növényi szomatikus és sejtgenetika, amihez szövettényésztésben történő növényregenerációra volt szükség. Így kezdtem steril táptalajon búzaszöveteket tenyészteni, növényeket regenerálni.

– *UNESCO-ösztöndíjjal a szövettényésztési témában jutott egyéves kanadai ösztöndíjhoz, ami nemzetközileg is versenyezős lehetőséget biztosított a növényi sejtgenetikában.*

– Igen. Saskatoonban, a Prairie Regional Laboratoryban tanultam meg a sejtfal nélküli sejtek, a protoplasztok fúziójának módszerét, és hazatérve majd egy évtizedig dolgoztunk a szomatikus hibrideken. A nyolcvanas évek elején a növényekkel is megkezdődtek a génebeszeti kutatások. Az SZBK-ban, miután Koncz Csaba csatlakozott a csoportomhoz, lehetővé vált a kukorica mitokondriális-DNS-klónoozása: ezzel egy új irányzat indult a hazai növénybiológiai kutatásban. Jőmagam a bostoni vendég-professzorságom két éve alatt tanultam meg a génebeszetet. Hazatérésem után a növényi gének izolálása és a transzgenikus növények előállítása lett kutatásaink központi témája. A szomatikus sejthibridizációval kapcsolatos munkáim képezték a biológiai tudományok doktora fokozat alapját, melyet 1984-ben szereztem meg. Az első hazai GM-növény előállításáról szóló dolgozatunkat 1986-ban közzöltük. Az Akadémia levelező tagjává 1990-ben, az agrártudományok osztálya javaslatára választottak meg, rendes tag ’95-ben lettem.

– *Pályájának meghatározó állomásai voltak a külföldi tanulmányutak, ám mindannyiszor hazatért. Nem aggódik a magyar tudósutánpótlás miatt, látva, hogy biztos jövőkép, avagy állás hiányában manapság egyre több fiatal keresi a boldogulását – nem csak ideiglenesen – idegen országban?*

– Bennem, helyesebben a családban fel sem merült a csábítás elfogadásának gondolata, az, hogy két év után Bostonban maradjunk a felajánlott álláshosszabbítással. Mi haza készültünk, és korábbi kollégámnak, Lázár Gábornak adtam át az MGH-beli (Massachusetts General Hospital) státuszomat. Ő örökölte a bérelt lakásunkat, és az öreg Ford Station Wagont. Mielőtt hazaindultunk, anyagi háttérrel akartam keresni a szegedi munkákhoz. Abban az időben az MGH projektet a Hoechst AG finanszírozta. A frankfurti kollégák segítettek abban, hogy a cégnek kutatási javaslatot tegyek. Elképzeléseim kedvező fogadtatásra találtak, és hazafelé megálltunk Frankfurtban a szerződést véglegesíteni. Ezzel több mint tízéves együttműködés kezdődött az SZBK és a Hoechst cég között. Természetesen, a fiatalokat ma más szemléletű prioritások irányítják kutatói karrierjük építésében. Szerintem sok tehetséges fiatalban él a hazai kötődés, de egy határon túl nem tudnak lemondani a kedvezőbb kutatási körülmények előnyeiről. Itthon kell elfogadható feltételeket teremteni, amelyek már esélyt nyújtanak a nemzetközi tudományos életben való részvételre. Láthatunk ígéretes kezdeményezést is. Pálincás József, a Magyar Tudományos Akadémia elnöke elindította a Lendület programot, amely kiemelt támogatást nyújt a hazatérőknek. Az igazi megoldást persze az jelentené, ha a hazai K+F általános anyagi helyzete javulna, és közelítene az uniós átlaghoz.

– *Milyen kutatóegységnek tartja magát? Olyannak, aki az alap kutatásban leli örömet, vagy agrármérnökként netán a megvalósítás mikéntjén is szívesen töri a fejét?*

– Hibridember vagyok: benne élek a legizgalmasabb növény-élettudományi kutatások világában, de a mezőgazdaság aktuális kérdéseit is figyelemmel kísérem.

– *Mi sem bizonyítja ezt jobban, mint nyílt és elszánt, harcos részvétele a GMO körüli vitákban. Úgy tűnik, minden – olykor személyes – támadást kivéve, nem adja föl a harcot. A közelmúltban jelent meg a munkatársával, Györgyey Jánossal közösen írt könyve, a „Zöld GMO-król”. Akit érdekel a téma, mindent megtudhat a genetikailag módosított növények laboratóriumi és szántóföldi viselkedéséről, hasznáról és esetleges veszélyeiről. Mi a kötet konklúziója, üzenete a közvéleménynek?*

– Már oly sokszor, szigorúan a tudomány tényeihez ragaszkodva megfogalmaztuk a géntechnológiával végzett növénynevelés előnyeit, hasznát. Ismét és ismét elmondjuk, hogy a génnemesített növények, a kiátkozott GMO-k, a magyar gazdák javát is szolgálhatnák, és biztosan szolgálni is fogják. A Nobel-békedíjas *Norman Borlaugot* idézve: „Ha az ózdkodóknak sikerül megállítani a mezőgazdasági biotechnológiát, éppen ők fogják előidézni azt az éhínséget és a globális biodiverzitás krízisét, amit majdnem negyven éve jósolnak.” Talán a hithű, a GMO-kat ellenző aktivisták és a félretájékoztató politikások jobban nyitottak a híres környezetvédőtől, Mark Lynastól származó idézetek megszívlelésére: „Az organikus mozgalom azonban gátolja a haladást, amikor elutasítja az innovációt. Hogy megint a GM-növényeket hozzuk fel példának: sok harmadik generációs GM-növényenél nincs szükség a környezetet károsító vegyszerek használatára, mert a szóban forgó növény genomját úgy változtatták meg, hogy meg tudja magát védeni a kártevőktől. Ez miért nem organi-

kus?"; vagy a másik: „De ami a legfontosabb: a gazdálkodóknak szabad választást kell biztosítani arra, hogy milyen technológiát kívánnak alkalmazni. Ha úgy gondoljátok, hogy a régi módszerek a legjobbak, rendben van, jogotok van hozzá. Nincs viszont jogotok másokat akadályozni, akik azért küzdenek, hogy új és remélhetőleg jobb módszereket dolgozzanak ki.”

– *A szakmai elszántságát megértem, de hogy bírja a támadásokat lelkileg?*

– Nagyon jól. Tudomásul veszem, hogy ez az ügy a politikusok kezei közé került. Abban a világban mások a szabályok, mint a kutatás vitáiban. Persze vannak „tudós” kollégáink, akik éppen a politikai hatalom hátszelével játsszák kárt okozó szerepüket. A sajtó szintén nem mer a tények mellett kiállni – igen kevés kivétellel –, hiszen biztosabb a hivatalos véleményt közvetíteni, még ha az meg is téveszti az embereket, és megfosztja a magyar agráriumot az egyik legjelentősebb innovációs lehetőségtől. Napjainkra érnek be azok a következmények, amelyek sok esetben a tudóstársadalom kiállításának elmaradásából származnak. Sorra terjesztik elő a szakmaiatlan törvényeket, a legutóbbi például börtönbüntetéssel fenyegeti a géntechnológiát alkalmazó kutatókat. Parlamenti elfogadása esetén ezzel meggátolják a mindennapi kutatómunkát, félelemben tartják a kutatókat, hiszen bármikor, bárkit bíróság elé lehet vinni, aki a nemzetközi gyakorlat szerint akarja végezni a munkáját. Maga az Alaptörvény is a GMO-mentes Magyarországgal „védi” a testi és lelki egészségünket, ugyanakkor a magyar állattenyésztés az import GM-szója nélkül ellehetetlenülne.

– *Ekkora ellenszélben sokan könnyen meginognának.*

– Nézze, 30 éve csinálom, a tudományos pályám csaknem felében ezzel a témával foglalkoztam. Amikor elkezdtuk ezt a munkát, álmunkban sem gondoltuk, hogy ez valamikor ekkora társadalmi vitát kelt. Valahol vakvágányra került a GMO-k ügye, pedig végeredményben egy precízebb, hatékonyabb, gazdaságosabb, az egészség számára kedvezőbb élelmezési lehetőségről van szó.

– *Nemcsak a magyar politika ellenzi: a szakmán belül is vannak nézetkülönbségek, s az eltérő gazdasági érdekek is gátolják a GMO-k térhódítását.*

– 2013-ban a világon 27 országban, 175 millió hektáron 18 millió gazda termesztett GM-növényeket. Amerikában 70, Brazíliában 40, Argentínában 24, Indiában 11, Kínában pedig 4 millió hektáron használtak génnemesített vetőmagot. Ezeket a számokat látva kicsit furcsa Heszky László professzor véleménye, hogy „a növényi géntechnológia, mint új kutatási és fejlesztési irány által előállított termékek (GM-fajták és -hibridek) valóban több sebből véreznek, félkész termékeknek tekinthetők, és a termesztésük sokféle kockázattal jár”. Miért ennyire közkedveltek mégis ezek a „félkész termékek”? Meg vagyok győződve arról, hogy a mostani, jól szervezett GMO-ellenesség füstté válik abban a pillanatban, amikor az Európai Unió olyan genetikailag módosított növények termesztését engedélyezi, amelyek a magyar gazdák számára is fontosak. Természetesen, az ökotoxikológiával foglalkozó kutatók közvetlen érdeke a

kockázatok hangoztatása, még annak ellenére is, hogy a kísérletek és a hivatalos engedélyező szervek megerősítik: a génnemesített növények kockázata hasonló, mint a hagyományos úton előállított fajtáké.

– *Éspedig? Mely növények kaphatnak zöld jelzést ön szerint?*

– Jelenleg három figyelmet érdemlő engedélyezési eljárás van folyamatban: a kukoricabogárnak ellenálló, illetve az aszálytűrő kukorica hibrid, és a burgonyabogárrezisztens krumpli vár a kedvező uniós döntésre a magyar gazdák érdekében is.

– *Gondolja, hogy bármilyen szakmai érv legyőzheti az okkal, ok nélkül gerjesztett félelmeket, a politikai, gazdasági érdekeket, a „vadzöldek” támadásait? Hiszi, hogy a nemrég megjelentetett ismeretterjesztést is szolgáló, tényekkel alátámasztott könyvük megrengeti, s meggyőzi a világot? Nincsenek erőfölényben az ellenzők? Eszébe sem jut, hogy földadja ezt a szélmalomharcnak tűnő küzdelmet?*

– Hiszem, hogy az emberek szemét tudományos alapú ismeretterjesztéssel kell felnyitni. Ez nyilvánvalóan nem könnyű, mert mi, kutatók könnyen elveszünk a részletekben. Készültek azonban ilyen népszerűsítő céllal filmek is. A képzett médiszakemberek sokat lendíthetnének a mostani holtponton. A politikusok határozottan elzárkóznak attól, hogy legalább csak meghallgassák a tényeket. Nem kíváncsiak a számokra, amelyek világosan mutatják a GMO-mentesség negatív gazdasági és környezetvédelmi hatásait. Sőt, ellenkezőleg: a hivatalos érvelés fennen hangoztatja, hogy előnyt élvezünk az Alaptörvényben kimondott GMO-mentes mezőgazdaságból. Sajnos, a konkrét számok nem ismertek. Talán hihetünk Vancsura Józsefnek, a Gabonatermesztők Országos Szövetsége elnökének, aki azt nyilatkozta: „Az viszont tény, hogy minden ellenkező híreszteléssel szemben a GMO-mentességet nem fizeti meg a piac”. Nem lehet kétségünk afelől, hogy előbb vagy utóbb a dolgok a helyükre kerülnek, és lecsillapodik a mesterségesen feltüzelt hisztéria. Az érdekeltekre, a gazdákra kell bízni a növénytermesztés mesterségét. A megtermelt termék minőségét, az önköltséget és a környezeti hatásokat indokolt mérlegelni.

– *Nagyon aktív, nyughatatlan természet: intézetvezetőként sem mellőzte a kutatást, könyveket írt és szerkesztett, dolgozatokat írt, konferenciákon tartott előadásokat, miközben 10 évig az SZBK Növénybiológiai Intézetének igazgatói feladatait is ellátta, 13 esztendőig pedig az ország legnagyobb élettudományi kutatóközpontját vezette. A hivatal menyire törte meg kutatói szerepvállalását?*

– Hetvenévesen az életmű teljesítményét jelző számok a mérvadóak. Ha a megjelent cikkeink impakt faktorát tekintjük, akkor a 330-as összérték talán figyelemre méltó. A munkánk hatását valójában az idézeteink száma (4430) és a Hirsch-indexem (38) jelzi. Nyilvánvaló, hogy ez a teljesítmény egy állandóan változó összetételű közösség munkájából származik.

– *Mi a véleménye a teljesítménymérés sokat vitatott szükségességéről, módszereiről? Hogyan lehetne finomítani, igazságosabbá tenni?*

– A mai, gyakran túlzásba vitt értékelési gyakorlatban sok a kritizálható tényező. Nem szabad elfeledkezni arról, hogy az impakt faktor a folyóirat paramétere és nem az ott megjelenő cikkek szerzőié. Az idézetek száma azonban már szerintem is megközelítően jelzi egy mű hatását. Fontos, hogy tudományterületenként igen különbözőek az idézési szokások. Az adott kutatási területet művelők száma is befolyásolja a kapható hivatkozások számát. A kutatói közösségek minősítésében jelentős szerepe van a publikációs eredményességnek, de az csak egyik komponense az átfogó értékelésnek, amit a látogató bizottságok még nagyobb biztonsággal végeznek el. Érdemes differenciáltan kezelni ezt a kérdést. Más megítélés alá esik például, ha egy oktató, és más, ha egy főállású kutató teljesítményéről van szó. A Hirsch-indexet az életmű minősítéseként tartják számon, az évek előrehaladtával javul ez a paraméter.

– *...igaz, de az idősebb kutatók első 10–20, talán legaktívabb évében még nem is jegyezték a Hirsch-indexet.*

– Ez valóban hiányosság, amit mérsékelhet, hogy idézettségi adatok viszont régebről is rendelkezésre állnak. Mint említettem, ennek a két jellemzőnek a megadását tartom a jelenlegi legjobb mérési módszereknek, bár még korrektebb lenne, ha a tudományterület átlagához viszonyítanánk az adott kutató adatait.

– *Az egyéni teljesítmény megítélésekor – a rangsorok összeállításakor, a támogatási pénzek odaítélésekor, a pályázatok minősítésekor – nem lenne indokolt különbséget tenni aszerint, hogy valaki 2-3 munkatárssal vagy kollaborációban akár 100 szerzővel jegyez egy dolgozatot? Gyakori vitatéma ez a kutatók körében.*

– Igen, ez is olyan kérdés, amit csak körültekintően lehet kezelni. Napjainkban a tudományos kutatás sok vonatkozásban „nagyüzemivé” vált. Nemcsak azért, mert a teljesítmények sokban függenek a drága berendezések, műszerek hozzáférhetőségétől, hanem azért is, mert az eredmények összeszerelő műhelyekben, sokféle szakértelem hozzájárulásával formálódnak. Tudomásul kell vennünk, hogy a nagy kutatói kapacitások előtérbe kerülnek, sőt megnő a külső, akár nemzetközi együttműködések jelentősége.

– *Milyen személyiségjegyek tesznek valakit alkalmassá arra, hogy több száz ember munkáját irányítsa, s az intézményt sikeres vizekre kormányozza?*

– Az igazgatás mindenekelőtt kompromisszumra képes személyiséget kíván, olyat, aki egyensúlyozni tud, és zökkenők nélkül megoldja a feladatokat.

– *Az SZBK aranykoraként emlegetik azokat az éveket, amikor professzor úr ült a főigazgatói székben. Ön hogyan ítéli meg ezt az időszakot?*

– Mindez korántsem egyetlen ember érdeme. Az SZBK működési rendszeréből következik, hogy meghatározó az igazgatók szerepe. Lényegében az ő vállukon nyugszik, hogy az intézetek csoportjai milyen teljesítményre képesek. A sikeresség azonban nemcsak a magas színvonalú cikkek közlésétől függ, legalább ilyen fontosságú a pályázati eredményesség. Amíg én voltam a vezető, az SZBK tartani tudta a mun-

kák színvonalát, biztosítottak voltak a működés feltételei. Köszönettel tartozom igazgatótársaimnak, akik sokban hozzájárultak a sikereinkhez. Külön szeretném megköszönni dr. Raskó Istvánnak az aktív szerepvállalását az SZBK jobbitásában.

– *Mit tekint főigazgatói pályafutása figyelemre méltó eredményének, és mit tekint kudarcnak?*

– Az Európai Molekuláris Biológiai Szervezet (EMBO) által végzett átvilágítás példaértékű lehetett volna a magyar tudományos világban. Sajnos, még manapság is csak szándék a nemzetközi megmérettetés. Az EU Kiválósági Központja cím elnyerése fontos eredmény volt az SZBK életében. A sikeres pályázatban kulcsszerepet játszott Kovács Kornél kollégánk. A Szegedi Egyetemmel erős partneri kapcsolatot tartottunk fenn, ami lehetővé tette, hogy nagyszámban vonjunk be diákköri és PhD-hallgatókat a kutatásba. Főigazgatóságom sikerének tartom, hogy létrehoztuk a központi laboratóriumokat, amelyek mindenki számára biztosítják a modern, drága berendezések használatát. Ez idáig sikertelenek voltak azok a kezdeményezéseink, amelyek a szegedi élettudományi kapacitásokra építve akartak biotechnológiai ipart kialakítani a városban. Mi indítottuk útjára a „Szeged Biopolisz” koncepciót, amely ugyan kapott formális támogatást, de végül nem sikerült sem a „Genomikai Innovációs Központ” sem a „Szegedi Bioinnovációs Park” beruházásának megvalósítása. A javasolt inkubátorkapacitások megteremtése még ma is elengedhetetlen feltétele annak, hogy például a gyógyszergyárak a városba telepítsék fejlesztési tevékenységüket.

– *Ekkora szakmai és vezetői tapasztalat alapján nem csoda, ha a tudományos testület tagjai az élő tudományok alelnökévé választották 2008-ban. Megtiszteltetésnek vehette a bizalmat, s szokott tettekeszségével föltehetően meg is akarta ezt szolgálni. Most, a mandátuma lejáratához közeledve hogyan érzi, sikerült?*

– Érzékenyen érint a kérdés... Hat év alelnökség után akár büszke is lehetnék, hiszen Straub F. Brunón kívül én vagyok csak az SZBK főigazgatói közül alelnök. Abszolút váratlanul ért ez a megtiszteltetés. Megérdemeltem-e, rászolgáltam-e, magam is kérdezhetném, ám úgy hittem, a vezetői, főigazgatói múltam alapján hasznot hajthatok a köztestületnek is. Miközben komoly presztízsadományként élem meg ezt a tisztséget, be kell látnom, hogy a hat év során a fokozatosan kialakult működési rendszerben az alelnökök kezdeményezési lehetőségei beszűkültek.

– *A hatéves alelnöki működése idején hozott elnöki intézkedések közül melyeket értékel pozitívan?*

– Pálinkás József elnök úrnak sikerült az MTA pénzügyi helyzetét stabilizálnia akkor, amikor az egyetemek többszöri költségvetési megszorítást is elszenvedtek. 2012-ben 7,7 milliárd Ft többlet révén 20%-kal nőtt a kormánytól kapott támogatás. Ez lehetővé tette a bővítést az OTKA-nál, a Lendület programban, bővült a kutatási infrastruktúra, a beszerzés, az egyetemi kutatócsoportok támogatása. A források szétesztásakor előtérbe került a pályázatadás. Befejeződött az MTA Természettudományi Kutatóközpont beruházása, ami valódi kutatási központként tud funkcionálni,

és világszínvonalú feltételeket biztosít a sikeres munkához. Döntés született a Társadalomtudományi Kutatóközpont új épületének megépítésére.

– *A döntések során mivel nem értett egyet? Hangot adott ellenvéleményének?*

– Messzebből kell indulni akkor, amikor az MTA működését mérlegre tesszük. Sajnos a problémák gyökere ott van, hogy Magyarországon nincs a kutatás és az innováció jelentőségét kifejező önálló kutatási minisztérium. Ezt a szerepet az Akadémia próbálta átvenni, de nyilván jelentősen korlátozott lehetőségek mellett. Működési rendszere fokozatosan, egyre jobban hasonlított egy minisztériuméhoz, ahol szabályok tömkelege születik, és a legfontosabb szereplők a Titkárság és a Jogi és Igazgatási Főosztály. Eközben a tudótestületi funkciók háttérbe kerültek. Csak szörványosan születhettek meg szakmai állásfoglalások, összakadémiai tudománypolitikai ajánlások, nagyon vigyázva arra, hogy elmarasztaló kritika ne fogalmazódjon meg, hiszen az Akadémia számára a kormányzati források életbevágóak. Így az osztályok aktív tanácsadói feladatai elsorvadtak. Márpedig a valamikori Alapszabály szerint: „az Akadémia a tudományos kutatások tendenciáinak alapján két évente javaslatokat fogalmaz meg a magyarországi tudományos kutatások irányait, szervezeti formáit, finanszírozását és egyéb feltételeit illetően. A javaslatokat a tudományos osztályok állítják össze, és az Akadémia elnöke szerkesztett formában – a Közgyűlés véleményének ismeretében – közzéteszi. A több tudományágat érintő ajánlásokat az érintett osztályokkal és kutatóhelyekkel is egyeztetni kell.” Főigazgatói és igazgatói tapasztalataim birtokában nem tudtam egyetérteni az eltúlzott központosítási döntésekkel. Különösen indokolatlannak találtam a különböző telephelyeken működő intézetek adminisztratív szempontok alapján kikényszerített házasságát. Nem tartottam elfogadhatónak, hogy az intézetek szakmai profiljának, tevékenységének minősítése nélkül, az érintettek feje felett születtek meg a döntések, elsődlegesen azt a szempontot követve, hogy minél kevesebb legyen a költségvetési helyek száma. Zavaró, hogy a központokon belül az intézetek szerepe leértékelődött, az igazgatók elvesztették kiemelt vezetői státuszukat. Engem személy szerint indulatos letolások értek, amikor próbáltam a vidéki akadémiai bizottságok gazdálkodási önállóságát megvédeni.

– *Emeritusz professzorként sem csökkent a munkakedve, aktivitása, lelkesedése...*

– A környezetem kedves figyelmessége tudatosítja bennem az idő múlását, azt, hogy 70 éves lettem. Munkabírásom, a teendők szünni nem akaró sorozata a régi. Noha már nem vagyok az SZBK közalkalmazottja, továbbra is az épületben dolgozom: a környezet inspirál.

– *Professzor úr, min dolgozik jelenleg?*

– Két új témát kezdtünk el kutatni. Az egyikhez egy nyertes Gazdasági Operatív Program pályázat nyújt anyagi háttérrel. A konzorcium célja az energiahálózatok biomassza-hozamának növelése. A Dombóváron működő Agrárbeta Kft. fafűtésű kazánnal biztosítja az energiát a bioetanol gyártásához és a biogáztermeléshez. Ez a cég, mint a konzorcium vezetője, érdekelt a fűzzel történő fűtésben. A mi feladatunk, hogy az

energiafűz kromoszómakészletének ($2n=38$) megduplázásával hozunk létre gyorsabban nöövő, nagyobb hozamú genotípusokat. Már vannak ilyen növényeink, és most jellemezzük a tulajdonságaikat. A másik témánk is genetikai beavatkozással kapcsolatos. Ma már lehetőség van arra, hogy irányítottan, egy kiválasztott génben hozunk létre mutációt. Ilyenkor rövid, szintetikus DNS-molekulákat használunk a gének szerkezetének specifikus megváltoztatásához. Célunk a módszer hatékonyságának növelése, hogy az a növények nemesítése során is alkalmazható legyen.

– *Ön alapította a Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesületet, mennyire sikeres ez a kezdeményezés?*

– A mai GMO-ellenes politikai szándékok közepette igen fontos szerepet tölt be az 1999-ben alapított szervezet. Egyedüli szakmai szerveződésként vívja harcát a géntechnológia létjogosultságáért, a génnemesített növények elfogadásáért, tájékoztatókat, konferenciákat rendez, könyveket jelentet meg szponzoraink, a kutatóintézetek, a nagyobb vetőmagcégek, egyetemek, magánszemélyek jóvoltából.

– *Hogyan telnek professzor úr nyugdíjas napjai, hogyan tartja karban magát?*

– A hét több napján úszom, szaunázom, s igyekszem több időt tölteni a családdal. Büszke vagyok a gyerekeimre, a hat unokámra. Ügyelek arra is, hogy a lelki egyensúlyom se billenjen ki: miként igazgatóként sem veszekedtem senkivel, nem emeltem föl a hangom, nem engedtem, hogy bármi kihozzon a sodromból, lehetőség szerint ma is megőrzöm a nyugalmamat, s igyekszem tisztességesen, a Tízparancsolatot nem megszegve élni ezután is.

– *Professzor úr, ha már szóba hozta a Tízparancsolatot: hadd utaljak arra az interjújára, amelyben őszintén vallott hitéről. Tévednék, ha föltételezem: istenhite és hite kutatói igazában valamiképpen egy töről fakad?*

– Valóban hiszem, s meggyőződésem, hogy a világ hosszú távú élelmezését, a fejlődő országok gondjait, a klímaváltozás következményeit a genetika eszközeinek segítségével mérsékelni lehet, s mindez az emberiség javát szolgálja. Erkölcsi kötelességünk, hogy a növények genetikai átalakításával is csökkentjük a földön a szenvedést. Gondoljon csak bele: másodpercenként éhen hal egy gyermek, s ma mintegy 850 millió ember éhezik a világon. Ha olyan növényeket hozunk létre, melyek mennyiség és minőség szempontjából megbízhatóan több és jobb termést eredményeznek, a beavatkozásunk etikailag is indokolt. Ezért vállalom hát akár a fájdalmas harci sebeket is...

II. A molekuláris módszereken alapuló növénynemesítés története az öröklődés szabályainak megismerésétől a genomikáig¹

KONCZ CSABA

A növényekkel foglalkozó tudományok történetét követve a következő három fejezetben célunk az, hogy ismertessük azokat az alapfogalmakat és törvényeket, amelyek alapján az olvasó megértheti a molekuláris biológia eszközeit fölhasználó növénynemesítés jelenlegi eredményeit és céljait.

1. Az öröklődés szabályainak megismerése és a növénynemesítés genetikai alapjai

Összefoglalás

A növénytermesztés kezdeteitől indulva, az első fejezet felidézi azokat a történelmi eseményeket, amelyek a természetes szelekció evolúciós szerepének és a tulajdonságokat meghatározó gének öröklődési törvényeinek megismerése után elvezettek a géneket hordozó kromoszómák felfedezéséhez. A mutáció, mutagenézis, rekombináció és géntérképezés elméleteit megalkotó kutatók munkáit ismertetve eljutunk a kontrolláló elemek fölfedezéséig, majd megismerjük, hogy a klasszikus nemesítés hogyan használja fel a kromoszómák mutagenézisét és fajok közötti kombinációját haszonnövényeink tulajdonságainak javításában.

Summary

By following the history of plant sciences, our goal in the first three chapters is to review those terms and rules, based on which the reader can understand current results and goals of plant breeding supported by the tools of modern molecular biology. Starting from the beginnings of crop cultivation, the first chapter evokes those historical events that, after understanding the evolutionary significance of natural selection and the laws governing the inheritance of trait-determining genes, led to the discovery that chromosomes are the carriers of genes. After gaining insight into seminal works of great scientists, who established the theories of mutagenesis, recombination and gene mapping, we arrive to the discovery of controlling elements, and then learn how classical plant breeding exploits the tools of mutagenesis and inter-species hybridization to improve properties of currently cultivated crops.

¹ Itt szeretnék hálás köszönetet mondani feleségemnek, Koncz (Kálmán) Zsuzsának a fejezetek szövegének fáradalmas javításáért és megírásukra buzdító támogatásáért. Hálával tartozom a könyv szerkesztőjének, Fehér Attilának a határidők többszörös meghosszabbítását biztosító türelméért és Szeles Annának a kézirattal kapcsolatos tanácsaiért.

„Aki nem néz vissza, irányt téveszt”
(Indián közmondás)

A növények házasításától a darwini evolúciós elméletig

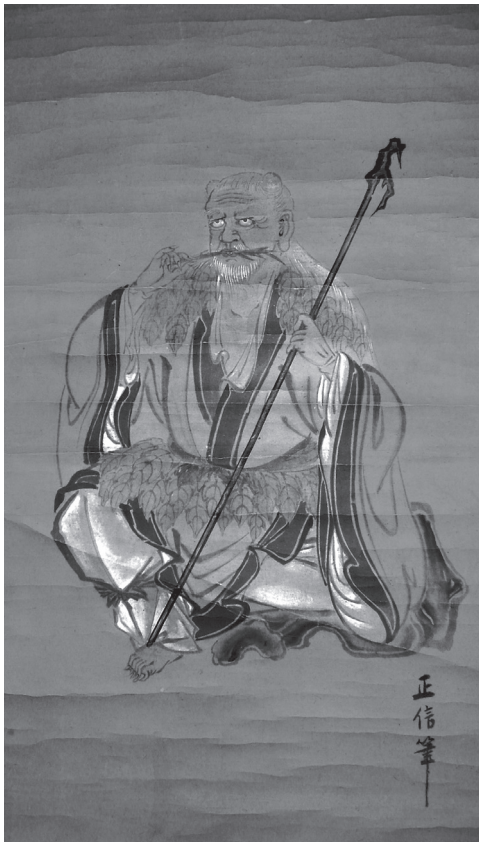
A régészeti kutatások szerint a növények tudatos termesztése kb. 10–15 000 évvel ezelőtt kezdődött a Közel-Kelet termékeny területein, de más kontinenseken is legalább 5–8000 éves múltra tekint vissza. A növénytermelés helyhez kötött, ezért a letelepedés az aktív termelési és törzsi-társadalmi szerveződés kezdetét jelzi. Ez a kőkorszaki forradalomnak nevezett időszak fontos fordulópont az emberiség történetében, mivel ettől az időszaktól kezdve az ember szaporodása és fennmaradása a mezőgazdasági termelés sikerének függvényévé vált. A neolitikumban megkezdődött az étkezésre és más célokra gyűjtött növények magvainak, hajtásainak és gyökereinek felszaporításával egy aktív szelekciós folyamat, a növények házasítása, domesztikálása. A napjainkban termesztett és fogyasztott növényfajok története azt mutatja, hogy mind az Ó- (Európa és Ázsia) és Újvilágból (Amerika és Ausztrália) származó fajok tudatos emberi szelekció termékei. A neolitikumtól az ókorig terjedő időszak első termesztett növényei a Közel-Keleten a vad *Triticum boeoticum*-ból (1. ábra) származó egyszemű *T. monococcum* és a *T. dicoccoides*-szel rokon tönke búza (*Triticum dicoccum*), az árpa (*Hordeum vulgare*, vad őse *H. spontaneum*), lencse (*Lens culinaris*), borsó (*Pisum sativum*), csicseriborsó (*Cicer arietinum*), cicorlencse (*Vicia ervilia*), len (*Linum usitatissimum*) és füge (*Ficus carica*). Az etiópiai fennsíkon, Afrikában és részben Egyiptomban megtalálható volt a cirok (*Sorghum bicolor*), köles (*Pennisetum glaucum*), korakánköles (*Eleusine coracana*), édesgyökér (yam, *Oxalis tuberosa*), olajpálma (*Elaeis guineensis*) és az afrikai rizs (*Oryza glaberrima*) is. A később elterjedt rizs (*Oryza sativa*) mellett ebben az időben a fő táplálék Kínában a róka-farkú köles (*Setaria italica*) és gyöngyköles (*Panicum miliaceum*), Észak-Amerikában pedig a kukorica, különböző bab- és tökfélék, valamint a burgonya, paradicsom, manióka, napraforgó és a spenóthoz hasonló *Chenopodium* család több tagja volt.



1. ábra. A vad búza (*Triticum boeoticum* var. *aegilopoides*) az egyik első termesztett búza, az egyszemű (*T. monococcum*) őse (fotó: Jonas Honegger; forrás: www.sortengarten.ethz.ch)

A fő gabona-, zöldség- és gyümölcsfajták mellett találunk régészeti forrást gyógyító, serkentő vagy bódító célból természetett növényekre is. Ilyen pl. az Etiópiában elterjedt kávé, a hasonlóan koffeintartalmú Nyugat-Afrikából származó kóla dió és a kevésbé ismert eufóriát okozó kat (*Catha edulis*).

A növények különböző hatásairól és alkalmazásairól szerzett tudás megőrzéséről a legősibb fennmaradt dokumentum Kínából származik. Shénnóng (az „Isteni Földműves”) herbalista (2. ábra) *Materia Medica* című könyvében több száz mérgező és gyógynövény saját magán vizsgált hatásairól számol be i. e. 2800-ban. Az i. e. 3–4. századra datálható indiai *Sushruta Samhita* szanszkrit gyűjtemény 700 gyógynövényt említ. Arisztotelész tanítványa, Theophrasztosz (i. e. 371–287) két enciklopédikus könyvében (*Historia Plantarum* és *A növények hatásairól*) egy, a késő középkorig használt növény rendszer- és természetstánt hagyott az utókorra. Az iszlám 8–13. századi térhódítása tovább segítette az afrikai és ázsiai növények (köles, citrom, narancs, rizs, gyapot stb.) Római Birodalomban megkezdődő európai behozatalát és elterjedését.



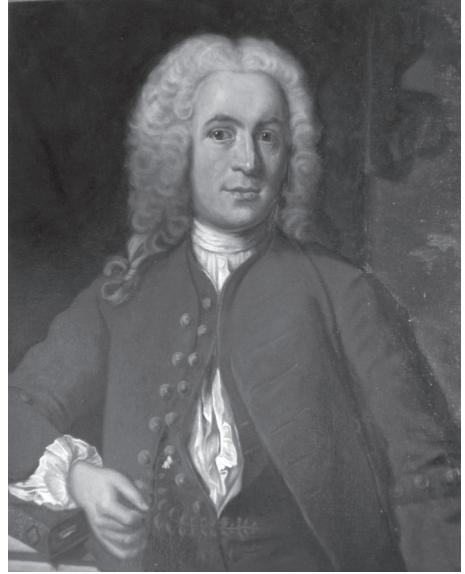
2. ábra. Shénnóng kínai herbalista (i. e. 2800-as évek) gyógynövény hatását próbálja ki saját magán (19. századi japán festmény)

Ebből a korszakból származó *Növények könyve* című művében Al-Dinawari (828–896) perzsa tudós 637 fajt említ, leírva azok fejlődését, növesztési igényeit, virág- és gyümölcstermesztési eljárásokkal fűszerezve. Az iszlám aranykor botanikusa, a Malagából származó Ibn al-Baitar (1197–1248) a 19. század kezdetéig használt gyógyszerészeti könyvében (*Kitáb Al-jāmi li-mufradāt al-adwiya wa al-aghghiya*) 1400 élelmiszer- és gyógynövény felhasználásait (pl. rózsaoaj- és parfümkészítést) ismerteti (Rashed 1996). Az első képekkel illusztrált, növényeket rendszerező munkák (*Herbarium vivae icones* és *Contrafayt Kräuterbuch*) a svéd Linné által a botanika atyjának nevezett német karthauzi barát, Otto Brunfels (1488–1534) tollából jelennek meg. Ezt követik a bajor Leonhart Fuchs (1501–1566; lásd: *Fuchsia* virágnév) 500 és a heidelbergi Hieronymus Bock (1498–1554) 700 európai növényt rendszerező Fűszerkönyvei. Amerika felfedezése után (Kolumbusz, 1492), a kontinensek közötti kereskedelem eredményeként Európában elterjedt az amerikai burgonya, paprika, paradicsom és kukorica, Kolumbiában az arab-etiópiai kávé, Floridában a mediterrán narancs,

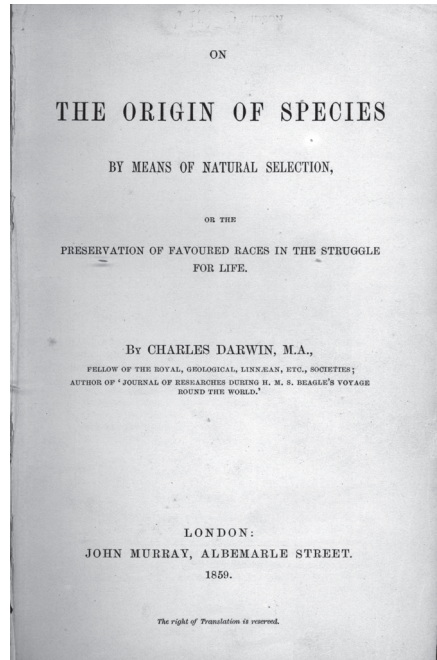
Ecuadorban a malajziai és pápua új-guineai banán. Azaz elindult az egyes növényfajok globális térhódítása.

A növények és állatok első átfogó, szisztematikus és hierarchikus rendszerezése közös külső jegyeik alapján az uppsalai Karl Linné (1707–1778) (3. ábra) nevéhez fűződik. Linné vezette be a ma is használt családot és fajt megjelölő kettős latin nevezéktant, és 1753-ban megjelent *Species Plantarum* című munkájában 7300-nál több növényfaj rendszertanát közli. Az már kevésbé ismert, hogy az e könyvben szereplő új fajok sokaságát Linné mellett 17 tanítványa, a különböző világtájakat bejáró „apostolok” gyűjtötték össze (pl. a James Cook óceániai hajóútajához csatlakozó Daniel Solander és Anders Sparrman), akik közül útjaikon többen életüket is áldozták a felfedezésekért. Linné kimagasló rendszertani munkássága logikusan fölvetett számos, a fajok eredetét és származását feszegető kérdést. Linné bibliai teremtés dogmáján alapuló rendszertanát kritizálva Georges-Louis Leclerc (Comte de Buffon, 1707–1788) az *Histoire naturelle* című munkájában először feltételezi, hogy a „teremtés centrumaiból” elvándorolt fajok differenciálódhattak új fajokká vagy kihalhattak, és e folyamatban az öröklődés fontosságára hívta föl a figyelmet.

Charles Darwin (1809–1882) 1859-ben megjelent *A fajok eredete* című munkájában (4. ábra) számtalan megfigyeléssel támogatja a fajok közös eredetét és evolúcióját. Ebben a folyamatban a gyakorlati nemesítő munkában használt szelekcióval analógiában a fennmaradásért folyó küzdelmet és környezethez való alkalmazkodást jelöli meg a természetes szelekció fő tényezőiként. Darwin munkáiban nem a fajt, hanem a fajok sok egyedből álló társulásaiban észlelhető kis eltéréseket határozza meg a diverzitás és természetes adaptáció forrásaként. A darwini



3. ábra. Karl Linné 1739-ben (Johan Henrik Scheffel festménye)



4. ábra. *A fajok eredete* 1859-es kiadásának címlapja

természetes szelekció tanát tagadták a transzformisták (vagy transzmutacionisták), mint például a francia biológus Jean-Baptiste Lamarck (1744–1829), aki 1809-es *Philosophie Zoologique* című művében az evolúciós változásokat az egyedek élete során környezeti hatásokra megváltozó, transzmutáló tulajdonságjegyek utódokba való átörökítésével magyarázta. Mások, mint pl. Robert Chambers skót újságíró, a *Teremtés természetes történetének hordozói* (1844) című névtelenül kiadott mű szerzője, az evolúciót kozmikus transzmutációk Isten által megtervezett és azóta öntörvényei alapján működő folyamatának tartotta. Az Intelligens Teremtő szerepét föltételező evolúció hívoival a vita meddőnek bizonyult, mert a lényegi kérdés nem tudományos, hanem teológiai volt és maradt.

Az öröklődés törvényeinek megismerése

A tulajdonságok öröklődésének magyarázatára Darwin pángezis elméletében (*Variation of Animals and Plants under Domestication*, 1868) feltételezte, hogy azokat sok kis örökítő faktor (gemmula) hordozza, amely a szülőkből a szaporodás során az utódokba jut. Robert Hooke (1635–1703) munkájának (*Micrographia*) köszönhetően az első, biológiai vizsgálatokat forradalmasító mikroszkóp már 1665-ben elkészült. Azonban Darwin gemmuláinak létezésére a közel 200-as nagyítással dolgozó Antony van Leeuwenhoek (1632–1723) holland mikrobiológus által konstruált mikroszkóp használatával sem tudott bizonyítékot találni Francis Galton (1822–1911), Darwin másod-unokatestvére, a biológiai biometria és a magasabb rendű humán intelligencia szelekcióját propagáló eugenetikai elmélet megalkotója. Ezzel szemben mikroszkópos vizsgálataikkal a jénai botanikus Matthias J. Schleiden (1804–1881) és a kölni fiziológus Theodor Schwann (1810–1882) 1837-ben fölfedezték, hogy az egysejtű mikroorganizmusokhoz hasonlóan a növények és állatok szövetei és szervei sejtekből épülnek föl, megalapozva ezzel a sejtelméletet, amely szerint az élet alapegysége a sejt. Ezt megelőzően Robert Brown (1773–1858) skót botanikus már 1831-ben észlelte, hogy minden növényi sejt hordoz egy sejtmagot, amely a sejthez hasonlóan osztódásra képes. Különböző festési eljárásokat kidolgozva Richard Altmann (1852–1900) további sejtorganellumként 1890-ben leírja a mitokondriumot (*Die Elementarorganismen*). Konstantin Mereschkowski (1855–1921) orosz biológus 1903-ban közli a később molekuláris módszerekkel igazolt teóriáját, hogy a mitokondrium és a sokak által korábban észlelt másik sejtorganellum, a kloroplasztisz valószínűleg mikrobiális eredetű. Bár tagadta a darwinizmust, Mereschkowski hitt abban, hogy a mikroorganizmusokkal való együttélés fontos szerepet játszik az evolúcióban. A bakteriológia atyjai, Louis Pasteur (1822–1895) a vakcinálás (védőoltás), fermentálás és sterilizálás fölfedezője, és Robert Heinrich Herman Koch (1843–1910), a baktériumizolálási és -tenyésztési módszerek, valamint a tuberkulózis, kolera és antrax kórokozóinak azonosítója (akinek asszisztense Julius Richard Petri, a Petri-csésze inventora) munkáikkal ezt a föltételezést lényegében igazolták az emberi populáció méretét drasztikusan befolyásoló kórokozókra.

Darwin műveiben gyakran hivatkozott a tudatos emberi szelekció példájára a nemesítés történetében, és sok prominens botanikus, maga Linné is foglalkozott növények keresztezésével. Azonban a hibridizációval kombinált tulajdonságok öröklődésének szabályai ismeretlenek maradtak Gregor (született Johann) Mendel (1822–1884) (5. ábra) munkásságáig. Mendel gondosan kiválasztott és sokszoros önmegporzással „tisztított” (beltenyészett) borsó variánsok (lásd eugenetika, tiszta vonalak) hibridizációjával foglalkozott a Szent Tamás templom Ágoston-rendi szerzeteseként Brnóban. Valószínűség-számítási adatokkal támogatott *Növényhibridizálási kísérletek* című



5. ábra. Gregor Mendel

közleményeiben, amelyek a brnói Természettörténeti Társaság 1865-ös kiadványai-ban jelentek meg, egy új tudományág, a genetika két alaptörvényét fogalmazta meg. Mendel első törvénye szerint egy tulajdonságért felelős öröklődő faktorból mindkét szülő két kópiát hordoz, amelyek egymástól elválasztva kerülnek át a hibridbe, majd páronként kombinálódva öröklődnek annak utódjaiban. A második törvény szerint, két eltérő tulajdonságért felelős faktor egymástól függetlenül kombinálódik a hibridben, és szegregál annak utódjaiban. Mendel azt is észlelte, hogy az egyik szülői faktor „erősebb”, domináns lehet a másik szülő „gyenge”, recesszív faktorához hasonlítva, és ezért lehetséges, hogy a hibrid csak az egyik szülő domináns faktora által meghatározott tulajdonságot mutatja. Ez az észlelés nem egyezett meg a darwini pángenezis azon tételével, mely szerint a szülői faktorok egyenlően befolyásolják az utód fenotípusát. Mendel értelmet adott annak a növénynemesítési gyakorlatnak is, amely során az új fajták tulajdonságainak stabilizálása céljából visszakeresztették a hibrideket az egyes szülőkkal. Ezt használta föl a hibridek önmegporzással nyert első, illetve második generációs utódjaiban öröklődő szülői faktorpárok azonosítására. Az utód keresztezését a recesszív faktorpárt hordozó szülővel Mendel alapján azóta is tesztkeresztelésnek hívjuk. A darwini pángenezis teória szerint az egyes tulajdonságokért, amelyek a populációkban normális eloszlást mutatnak, nagyszámú faktor felelős, és ezért az utódban kombinálódó szülői faktorok átlaga határozza meg végül a fenotípust. Ezzel szemben Mendel törvényei alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a szülői jegyek öröklődési gyakorisága a kétfaktoros (binomiális) eloszlást követi. Mivel egy populációban az azonos jegyekért felelős, de egymástól különböző faktorok gyakorisága megközelítheti a normális eloszlást, a populációk szintjén a darwini elmélet továbbra is alkalmazhatónak tűnt. Azaz, ha kettőnél sokkal több faktor befolyásol egy mennyiségi tulajdonságot, mint pl. magméret, termésátlag vagy szár és gyökérnövekedés, akkor a sok faktorpár mért hatása, illetve eloszlása ugyancsak közelíti a normális el-

oszlást. Talán azért nem sikerült a kor nemesítőinek hamarabb fölfedezni az öröklődés törvényeit, mert sok faktor által meghatározott tulajdonságokat követtek, és így nem látták az erdőtől a fát.

Kromoszómák a tulajdonságokért felelős gének hordozói

Egy biztos, Mendel eredményeit haláláig ignorálták a darwini pángenezis öröklődési faktorok szabad keveredését valló hívei. Ezek közé tartozott a holland születésű Hugo Marie de Vries (1848–1935), aki Julius Sachs (1832–1897), a növényélettani kísérletek úttörőjének, a bonn-poppellsdorfi, majd würzburgi egyetem professzorának tanítványa volt. De Vries 1889-es *Intracellular Pangenesis* című munkájában a tulajdonságok örökléséért felelős faktorokat a pángenezis teóriának megfelelően pángénnek nevezte. Az öröklődési faktorok által meghatározott tulajdonságokat érintő változások elnevezésére először a transzformisták (lamarckisták) használták a transzmutáció elnevezést, amit de Vries munkáiban mutációra rövidít. Ennek nyomán a mutációhoz vezető folyamatot mutagenezisnek nevezte. Wilhelm Johannsen (1857–1927) dán növényfiziológus és genetikus, aki a Karlsberg sörgyárban az árpamagok nyugalmi és csírázási folyamatait tanulmányozta, a gén rövidítést használta az öröklődési faktorok jelölésére. Johannsen a magméretet mint kvantitatív mennyiségi jegyet befolyásoló faktorok vizsgálata alapján használta először a genetikai háttér jelölésére a genotípus és a gének által meghatározott jegyekre a fenotípus terminológiát.

Az 1890-es években a pángenezis igazolását célzó keresztezési munkáiban de Vries lényegében újra felfedezte Mendel törvényeit. Hasonló eredményre jutott 1900-ban további három kutató, a tübingeni német genetikus Carl Erich Correns (1864–1933), a pullmani búza genetikus William Jasper Spillman (1863–1931), a mezőgazdasági közgazdaságtan későbbi atyja, és az osztrák agronómus Erich Tschermak von Seysenegg (1871–1962), a bécsi egyetem professzora. Tschermak anyai nagyapja Eduard Fenzl botanikus a bécsi egyetemen tanította Mendelt. Correns a pollenképződéshez vezető sejtosztódás, növényi sejtfal és protoplazma (citoplazma) fogalmakat bevezető svájci botanikus Carl Wilhelm von Nägeli (1817–1891) tanítványa volt. A sors fintora az, hogy Nägeli sűrű levelezésben állt Mendellel, és próbálta őt kísérleti munkáiról lebeszélni. Correns a zöld-fehér levél variegációt mutató nagy csodátólcsér (*Mirabilis jalapa*; 6. ábra) mutánsokkal végzett kísérletei során fölfedezte a nem mendeli, citoplazmás öröklődés törvényét is. Ugyanis az általa tanulmányozott *iojap*-nak nevezett fehér levélszint okozó recesszív jegy a keresztezés irányától függő anyai öröklődést (dominanciát) mutatott: a fehér *iojap* anya zöld növény pollenjével megtermékenyítve fehér, míg a zöld anya *iojap* pollennel megtermékenyítve zöld utódot eredményezett. Mint később kiderült, az *iojap* növények fehér színe a kloroplasztiszok hibás funkciójának volt tulajdonítható. Azaz, kísérleteiben Correns kimutatta, hogy a kloroplasztisz is hordoz tulajdonságokat örökítő anyagot.

Egy gén különböző mutációinak jelölésére William Bateson (1861–1926) galtonista angol biológus (Bateson 2002) vezette be az allél elnevezést. Bateson a külön-



6. ábra. Zöld-fehér levélvariegációt mutató nagy csodatölcsér (*Mirabilis jalapa*)

böző organizmusok strukturális jegyeinek variációit vizsgáló 1894-es (*Materials for the study of variation*) biometriai könyvében fölfedezi, hogy több tulajdonság a darwini pángenezis elméletével szemben nem normál, hanem dimorfikus (binomiális) eloszlást mutat. Ennek megfelelően a domináns vagy recesszív génpárokat, alléleket hordozó szülők megjelölésére Mendelhez hasonlóan használja a homozigóta elnevezést, hogy megkülönböztesse azokat a két különböző allél kombinációját tartalmazó hemizigóta, illetve heterozigóta utódoktól. Bateson barátja, Erwin Baur (1875–1933), az első német növénynemesítési intézet megalapítója Berlinben, igazolta Correns kloroplasztisz-jegyek öröklődésével kapcsolatos szabályait, és az eugenetika híveként a mendeli „tiszta jegyeket” hordozó fajok szelekciójának és azok hibridizációjának, nemesítésének egyik szószólója volt. Áltudományos háttérként Baur növényekkel és állatokkal végzett eugenetikai munkáira hivatkoztak halála után a fasiszta fajelmélet későbbi megalkotói.

A testi szomatikus sejtek és ivarsejtek (gaméták) első világos funkcionális megkülönböztetése a freiburgi August Weismann-nak (1834–1914) köszönhető, aki 1885-ben megjelent (*Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung*) munkájában megállapítja, hogy a szomatikus sejteknek nincs szerepe a tulajdonságok átörökítésében, amelyért kizárólag csak az ivarsejtek a felelősek. Mendel

munkáját nem ismerve, Weismann definiálja a két szülői ivarsejt szerepét az öröklődésben. A sejtosztódás mechanizmusát leíró 1882-es (*Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung*) könyvében a kielii egyetem professzora, a citogenetika atyja, Walther Flemming (1843–1905) megállapítja, hogy a szalamandra és más állatok sejtjeiben a sejtmagok bázikus anilinnal festődő anyagot, „bazofil” kromatint tartalmaznak, amely jellegzetes méretet és formát mutató festődő testecskék párjaiba rendeződik a sejtosztódás során. A Flemminggel dolgozó berlini anatómus Wilhelm von Waldeyer-Hartz (1836–1921) ezeket a struktúrákat, amelyeket Nägeli már 1842-ben leírt osztódó polensejtekben, „festődő testecskéknek”, kromoszómáknak nevezi el (7. ábra).

A testi sejtek osztódása során, amelyet mitózisnak nevez, Flemming észleli, hogy a kromoszómák egyenlő számban jutnak át az utódsejtekbe. Ezért megállapítja, hogy minden sejtmag öröklődően egy előző sejtmagból származik (omnis nucleus e nucleo). 1876-ban Oscar Hertwig (1849–1922) berlini zoológus a tengeri uborka ivarsejttermelésének vizsgálata során fölfedezi a meiózis folyamatát (*Lehrbuch der Entwicklungsgeschichte des Menschen und der Wirbeltiere*, 1906), amelyet a liège-i egyetem belga zoológusa, Édouard Van Beneden (1846–1910) tanulmányoz először kromoszóma szinten. A meiózis szerepét az ivarsejtek produkciójában és az öröklődésben először azonban csak August Weismann értelmezi 1890-ben. A kromoszómaszámot megtartó ekvatoriális mitotikus sejtosztódást (Äquatorialteilung) Weismann megkülönbözteti a kromoszómaszámot redukáló meiózis (Reduktionsteilung) folyamatától, amelyben két egymást követő osztódás szükséges ahhoz, hogy egy diploid sejtből négy, a kromoszómaszám felét hordozó haploid sejt keletkezzen. Wilhelm Roux (1850–1924) német zoológus már 1883-ban feltételezi, hogy az öröklődésért felelős faktorok hordozói a kromoszómák.

Roux, Ernst August Haeckel (1834–1919) német zoológus és embriológus tanítványa volt, aki hasonlóságot talált az állati és emberi embriók fejlődésének különböző fázisai között. Roux vezeti be az embrió, sejt- és szövettenyésztés, valamint sejt- és szövetátültetés (átoltás, gráftolás) módszerét, és írja le először, hogy a megtermékenyítés után a zigótából osztódó sejtek funkcionálisan specializálódnak, azaz differenciálódnak. Roux ebből az észleléséből azt a következtetést vonja le, hogy az egyedfejlődést az embrióban mozaikszerűen eloszló genetikai faktorok szabályozzák. Ezzel szemben Haeckel másik tanítványa, Hans Driesch (1867–1941) kimutatja, hogy a tengeri uborka négysejtes embrióinak minden sejtje szeparálás után képes embrióvá, majd teljes organizmussá fejlődni. Driesch ezzel nemcsak igazolta, hogy minden sejt azonos genetikai anyagot hordoz, de a totipotencia és pluripotencia fogalmainak bevezetésével azt prediktálta, hogy minden sejt képes egy organizmus összes sejtjének létrehozására, és hogy sokfajta más sejtte differenciálódhat.

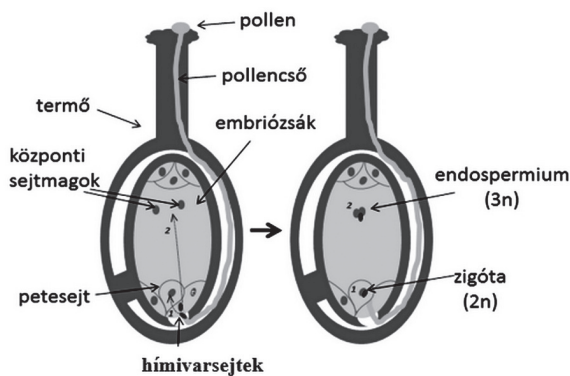
Driesch a nápolyi zoológiai állomáson ismerte meg az odalátogató amerikai embriológust Thomas Hunt Morgant (1866–1945) (8. ábra), aki tanulmányútja során kimutatta, hogy a tengeri uborka petesejtjei megtermékenyítés nélkül, egyszerű magnézium-klorid oldat kezeléssel osztódásra készíthetők. Munkáját folytatva Morgan barátja, Jacques Loeb (1859–1924) megtermékenyítés nélkül produkált petesejtek-ből békákat, az apa nélküli szűzfogamzás, a parthenogenezis lehetőségét bizonyítva.

Hans Winkler (1877–1945) hamburgi botanikus, aki Morganhoz hasonlóan vendégkutatóként dolgozott a nápolyi zoológiai állomáson, a 40-nél több növény család több mint 400 fajában észlelhető, megtermékenyítés nélküli magképzés változatos módjait apomixis összefoglaló névvel jelölte (Winkler 1920). A haploid ($1n$) kromoszómakészletre ő alkalmazta először 1908-ban a genom elnevezést.

Winkler úttörő munkájának és a növényi citogenetika fejlődésének köszönhetően Szergej Gavrilovics Navasin (1857–1930) kijevi és Léon Guignard francia biológus 1888–89-ben felfedezik, hogy a magasabb rendű növények embriói kettős megtermékenyítéssel (9. ábra) keletkeznek (Hamamura et al. 2012). A Wilhelm Hofmeister (1824–1877) tübingeni botanikus munkásságával kezdődő növényi reprodukciós kutatásoknak köszönhetően ismertté vált, hogy a diploid ($2n$) szövetekből kifejlődő női ivarszerv tápláló parenchima (nucellusz) szövetéibe ágyazott megagametofita anyasejt meiózissal négy haploid utósejtet, makrospórát hoz létre. Ebből általában 3 degenerálódik, amíg a fennmaradó életképes sejtben 3 mitózis történik sejtosztódás nélkül, ami a kialakuló embriózsák két pólusán $4+4$ haploid sejtmagot hoz létre. A pólusoktól az embriózsák közepére vándorló két sejtmagból alakul ki a diploid központi sejt. Amíg az egyik póluson 3 ellenlábás (antipód) sejt, addig a másik póluson 2 segítősejt és az általuk közrefogott petesejt jön létre az embriózsákot további 6 haploid sejtre bontó sejt-falszintézis után.



8. ábra. Thomas Hunt Morgan (1866–1945) a Johns Hopkins Egyetem 1891-es évkönyvéből



9. ábra. A kettős megtermékenyítés: a pollencsővön keresztül két hímivarsejt jut az embriózsákba. Az egyik (1) a petesejtet megtermékenyítve létrehozta a diploid zigótát, a másik (2) a két központi sejt-maggal összeolvadva a triploid endospermiumot

Eduard Strasburger (1844–1912) teljes növényvilágot átölelő 1894-es Bonni Tankönyvében (Finke et al. 1994) a női ivarsejtet létrehozó folyamat, a megagametogenezis számos érdekes variációját ismerteti, például azt, hogy a liliomfélékben a meiózis után mind a négy makrospóra életképes marad. Kimutatja, hogy a női gamétaképzéssel szemben a hímivarsejtek kialakulásának folyamata kevesebb variációt mutat a növényvilágban. A porzó (vagy mikrosporangium) diploid sporogén sejtjeiből differenciálódik a mikrospóra anyasejt, amelynek meiotikus osztódása 4 tetrád formában elrendeződő haploid mikrospórát eredményez. A mikrospórák ezt követő első mitotikus osztódása hozza létre a pollencsővé differenciálódó vegetatív sejtet és az egy további mitózissal két spermasejtet produkáló generatív sejtet. Az utóbbiak közül a megtermékenyítés során az egyik a petesejttel egyesül az embrióvá fejlődő zigótában, a másik pedig a diploid központi sejtrel fuzionál, amelyből a triploid ($3n$) endospermium, a fejlődő mag tápszövevei keletkeznek.

A Winkler által tanulmányozott apomixist mutató növénycsaládokban (pl. pázsitfűfélék) a diploid megagametofita összejt a meiózis előtt sejtosztódás nélküli endomitózissal tetraploiddá válhat (pl. kölesfélék). Más fajokban a meiózis teljes kimaradása (pl. hölgyalm, *Hieracium* fajok; 10. ábra) vagy a meiózis első kromoszómaszám-felező sejtosztódásának hibája (pl. pitypang, *Taraxacum*-félék) nem redukált, tetraploid ($4n$) vagy diploid ($2n$) kromoszómaszámot hordozó petesejtet eredményez, ami a központi sejt megtermékenyülése után vagy anélkül embrióvá fejlődik. Más esetekben (pl. napraforgó) a makrospórák a meiózis során vagy után elhalnak, de funkciójukat egy, a nucellusz szomatikus sejtjéből származó diploid, ún. apogaméta veszi át, amely embriózássá, illetve embrióvá és endospermiummá alakul megtermékenyítés nélkül. Végül a virágzaton belül vagy más szerveken (pl. varjúháj, *Kalanchoe*-félék) egyes fajok képesek vivipáriára („elevenszülésre”, sporofita apomixisre), azaz embrió létrehozására testi sejtjeikből.

Az apomixis eredménye az anyai jegyek domináns és kizárólagos öröklődése, amellyel már Mendel is találkozott *Hieracium*mal végzett keresztezési kísérleteiben. Mendel keresztmegporzással nyert *Hieracium* növények utódgenerációiban kizárólag csak az anyanövények fenotípusát mutató utódokat talált, hiába keresve ennek magyarázatát (Nogler 2006). A *Hieracium* esetében észlelt, borsótól eltérő öröklésment értelmezésével kapcsolatos csalódása felbukkan Nägelivel folytatott levelezésében, okot szolgáltatva a *Hieracium*-szakértő Nägeli kétkedésére Mendel törvényeit illetően (Correns 1905). Ehhez hozzájárult az is, hogy de Vries ligetszépe (*Oenothera*) fajokkal végzett keresztezései is a *Hieracium*mal észlelt eredményeket mutatták. Bár Mendel észlelte a parthenogenezis jelenségét méhekkel végzett kísérleteiben, a probléma banális megoldását végül mégis a koppenhágai botanikus kert professzora, Carl Hansen Ostenfeld (1873–1931) találta meg, aki rájött, hogy a *Hieracium* hibridek megtermékenyítés nélkül is produkálnak parthenogenezissel utódokat (Ostenfeld 1904). Őt megelőzően Hans Oscar Juel (1863–1931) svéd botanikus 1898-ban közölte, hogy a macskatalpfélék (*Antennaria*) embriói a testi sejtekkel azonos $2n$ kromoszómaszámot mutató diploid petesejtekből jönnek létre (Juel 1898).

A növényfajok jellemzése során Strasburger megállapította, hogy minden faj egy arra jellemző kromoszómaszámot hordoz. Ezt Hertwig tanítványa, a würzburgi egyetem professzora, Theodor Heinrich Boveri (1862–1915) állati ivarsejtekkel végzett kutatásai is igazolták. Strasburgerhez hasonlóan Boveri észleli, hogy egyes testi sejtekben a sejtosztódás hiányában történő endomitotikus magosztódások 2, 4, 8 vagy akár magasabb szintre emelhetik a normális diploid kromoszómaszámot. Poliploid tumorsejtekben Boveri gyakori kromoszómaszám-vesztést is észlelt. Továbbá azt tapasztalta tengeri uborkával végzett kísérleteiben, hogy a kromoszómavesztés gátolja az embrió fejlődését. Azaz, a kromoszóma szükséges a genetikai információ átviteléhez. A szöcskepeték morfológiailag különböző X-kromoszómáját fölfedező Erwin McClunggal (1871–1946) dolgozó Walter Sutton (1877–1916) ezzel egy időben észleli a kansasi egyetemen, hogy a homológ kromoszómák párosodnak, majd függetlenül szegregálódnak meiózisban. Sutton, Boveri-höz hasonlóan azonosítja a kromoszómákat a Mendel által definiált, tulajdonságokat meghatározó faktorpárok hordozóival (Crow és Crow 2002). Suttonnal egy időben Edmund Wilson (1856–1939) tanítványa, William A. Cannon hasonló következtetésre jut gyapot kromoszómákat tanulmányozva a Columbia egyetemen. A Boveri–Sutton-kromoszómaelmélet további bizonyítékeként 1895-ben Wilson és későbbi munkatársa Nettie Stevens (1861–1912) fölfedezi lisztkukacban a szexmeghatározásért felelős anyai X- és apai Y-kromoszómákat és azok független mendeli szegregációját a meiózisban. Stevens, Morganhoz hasonlóan Nápolyban is dolgozott vendégkutatóként. Ő javasolja a Wilson professzor helyébe lépő Morgannak, hogy a szexkromoszómákhoz kapcsolt jegyek öröklődését ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*), a Harvard egyetem genetikusai Charles W. Woodworth (1865–1940) és William Castle (1867–1962) által kiválasztott új modell organizmusban tanulmányozza.

Rekombináció, kapcsoltság és géntérképezés

1885-ben, a hohenheimi mezőgazdasági egyetem professzoraként, Wilhelm Conrad Röntgen (1845–1923) német fizikus fölfedezte az elektromágneses (X) sugárzást. Az I. világháború alatt Röntgen maga is készült kivándorolni professzorként a Columbia egyetemre, ahol 1908-tól Morgan röntgenbesugárzással próbált *Drosophila*-mutánsokat előállítani. Morgan, Batesonhoz és de Vrieshez hasonlóan, nem hitt a darwini allélek lassú populációs változásain alapuló evolúcióban, hanem a mutációk génekben okozott változásait tartotta új fajok létrejöttének okaként. Az első *Drosophila*-mutánsok között, a recesszív fehér szemszínért felelős *white* mutációról 1911-ben kimutatja, hogy az a szexkromoszómával együtt, azzal kapcsolatosan öröklődik. Ezzel egyben igazolja, hogy a tulajdonságokért felelős faktorok hordozói a kromoszómák. Röviddel később Morgan és munkatársai azt észlelik, hogy egy másik szexkromoszómához kapcsolt, miniatűr szárny kialakulásáért felelős faktor a *white* mutációval kombinálva a várt mendeli független kétfaktoros szegregációs aránytól eltérően

nagy gyakorisággal együtt, azaz kapcsolatosan szegregál az utódokba. Két jegy kapcsolatos öröklődését valamivel korábban a genetikai faktorok közötti hierarchikus kölcsönhatásokat (episztázist) fölfedező Bateson, a virágjegyek polimorfizmusának öröklődését tanulmányozó Edith R. Saunders (1865–1945) és a mendeli szegregációs arányok számítását egyszerűsítő táblázatok megalkotója, Reginald Punnett (1875–1967) is észlelte. Punnett kérésére Godfrey Hardy (1877–1947) angol matematikus, és vele egy időben a württembergi német fizikus Wilhelm Weinberg (1862–1937) dolgozta ki a függetlenül és kapcsolatosan öröklődő faktorok populáción belüli gyakoriságát leíró matematikai elméletet, amely a genetikai egyensúly (ekvilibrrium) Hardy–Weinberg alaptételeként vált később ismertté.

A szexkromoszómához kapcsolatos recesszív mutációkat hordozó és vad típusú muslicák keresztezése során Morgan fölfedezte, hogy két kapcsolatos jegy bizonyos gyakorisággal szeparálódik az utódokban. Ezért feltételezte, hogy a szülői kromoszómák egyes szakaszai kölcsönösen, reciprok módon kicserélődhetnek az ivarsejteket produkáló meiózis folyamata során, ami a szülői jegyek új kombinációját, azaz rekombinációját eredményezi. Morgan feltételezését Frans Alfons Janssens (1865–1924) leuveni belga citológus eredményeire alapozta, aki észlelte, hogy a meiózis I. profázisa során a kromoszómapárok kromatidjai a pachitén fázisig észlelhető sokszoros X alakú átkevereződést (crossing-over-t vagy kiazmat) mutatnak.

Morgan tanítványa, Alfred Henry Sturtevant (1891–1970) megállapítja, hogy a szexkromoszómához kapcsolatos tulajdonságokat meghatározó gének a kromoszómán lineáris sorrendben helyezkednek el. Sturtevant 1913-ban észleli, hogy különböző gének vad és mutáns alléljei közötti kicserélődések, azaz rekombinációk gyakorisága egymástól eltérő. Három gén (A-B-C) különböző párosítása (A-B, B-C és A-C) során Sturtevant megállapítja, hogy a két szélső gén (A-C) között észlelt rekombinációk gyakorisága a másik két génpár (A-B és B-C) között észlelt rekombinációk gyakoriságának az összege. Ebből logikusan következik az, hogy a három gént elválasztó két kromoszómaszakaszon (A-B és B-C) egyszerre megtörténő, ritka kettős rekombinációknak a valószínűsége a két kromoszómaszakaszon (A-B és B-C) egymástól függetlenül észlelt rekombinációk gyakoriságának a szorzata. E két szabály fölhasználásával, amely lehetővé tette a gének sorrendjének és egymástól való távolságának megállapítását a rekombinációs gyakoriság alapján, Sturtevant lefektette a géntérképezés alapjait (Sturtevant 1913). Sturtevant azt is felfedezi, hogy a kromoszómák egyes régióiban két gén közötti kiazma kialakulása interferálhat a szomszédos gének között történő rekombinációval. Ezért a rekombinációs értékek összegzésén és szorzatán alapuló törvényeket szükséges volt kiegészíteni egy, az interferenciát is figyelembe vevő matematikai térképezési funkcióval. Ezt a térképezési funkciót, ami a rekombinációs gyakoriság értékét a vizsgált események számát is tükröző statisztikailag ellenőrizhető értéké alakítja át, John Haldane (1892–1964) angol genetikus-matematikus alkotja meg, aki a genetikai térképezést Morgannak kereszteli. Haldane további munkáiban (*The Causes of Evolution*, 1932) lefekteti a természetes és mesterséges szelekció matematikai elméletét. A Haldane törvényének nevezett evolúciós elmélet egyik fontos megállapítása az, hogy a női X-kromoszómális gének mutációi

a csak egy X-kromoszómát öröklő hím utódokban dominánsan manifesztálódnak. Ezért a szexkromoszómához kapcsolt gének evolúciója a nem nemi (autoszomális) kromoszómák génjeihez hasonlítva gyorsabb.

Mutációs elmélet és sugárgenetika

Hermann Muller (1890–1967), aki 1912-ben Morgan doktoranduszaként kezdte pályafutását, a hímekben letalitást okozó spontán és röntgensugárral indukált X-kromoszomális mutációk gyakoriságát vizsgálta. 1919-ben Muller azonosított egy olyan X-kromoszomális mutációt, amely a gének közötti rekombinációt gátolta. Ennek eredményeként X-kromoszómáin letális mutációt és annak vad alléljét hordozó heterozigóta anya a várt 1:1 aránynál magasabb számban produkált életképes hím utódokat. Morgan Mullerrel dolgozó másik tanítványa, Calvin Bridges (1889–1938) és később Sturtevant citológiai vizsgálatokkal kimutatták, hogy Muller rekombinációt szuppresszálo mutációját egy kromoszóma szegment inverziója okozta. Az inverzió az anyai X-kromoszómák homológ kromatidjainak meiotikus szeparálódását gátolta, azaz kromoszóma non-diszjunkciót okozott (Bridges 1916). Az összekapcsolt bivalens X-kromoszómán az inverzió közelében a rekombináció ritka. Ezért keresztezés után a kapcsolt X-kromoszómán található letalitást okozó mutációk és azokat egyensúlyozó domináns vad allélek együtt öröklődnek. Ennek következménye az, hogy a kapcsolt X-kromoszómák vad allélje kiegyenlíti a recesszív mutáció okozta letalitást, ami nem észlelhető a hím utódokban.

Morgan, Sturtevant, Muller és Bridges 1915-ben kiadott könyve (*The Mechanism of Mendelian Heredity*), amelyben a mendeli öröklődés kromoszómákhoz kapcsolt mechanizmusait ismertetik, óriási hatással volt a modern genetika és biológiai gondolkodás további fejlődésére. E korszakalkotó munkát elismerő Nobel-díj átvételét Morgan 1933-ban egy évvel elhalasztja Bridges új kísérleti eredményei miatt. Nettie Stevens ötletét felhasználva Bridges a *Drosophila*-lárvák nyálmirigyjeiben endomitózissal keletkező óriás politén kromoszómákon észlelhető sávok vizsgálatával kideríti, hogy azok jelenlétét és lineáris elrendeződését különböző mutációk közvetlenül megváltoztatják (Bridges 1916). Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a sávok egy vagy néhány génnek felelnek meg, amit a későbbi kutatások igazoltak. Így a génekben mutációval indukált változások a citogenetika eszközeivel követhetővé váltak.

1914-ben Julian Huxley (1887–1975), aki fölfedezi, hogy az apai X-kromoszómák egyes génjei inaktiválódhatnak, vagy domináns aktivitást mutathatnak a két X-kromoszómát hordozó női utódokban, meghívja Mullert houstoni laboratóriumába. Muller ott ligetszépefélék (*Oenothera*) mutagenézisével foglalkozik, és kideríti annak okát, hogy de Vries miért észlelte azt, hogy az *Oenothera* fajok Mendel *Hieracium*jához hasonlóan nem mutatják a tulajdonságok szegregációját az utódokban. Muller fölfedezi, hogy *Drosophila*-mutánsához hasonlóan, reciprok transzlokációk és inverziók eredményeként az *Oenothera* kromoszómák a meiózisban kört formálnak, mivel rekombináció csak a kromoszómavégeken történik meg. Így a kromoszómák együtt

maradva kerülnek át az utódokba, ahol a recesszív mutációk hatása nem észlelhető, mert az összekapcsolt kromatidák hordozzák az azoknak megfelelő vad alléleket. Röntgen-besugárzással Muller képes a körkromoszómákban töréseket indukálni és ezzel a recesszív jegyeket függetlenül átvinni az utódokba. Ez a mutációk független szegregálása és homozigóta recesszív utódok megjelenése miatt megdöbbentő fenotipikus variációt eredményezett. Mivel az észlelt új fenotípusok hasonlóságot mutattak azokkal a jegyekkel, amelyek alapján az egyes *Oenothera* fajokat korábban megkülönböztették, a Muller által felfedezett mutációs mechanizmus lehetséges magyarázattal szolgált új *Oenothera* fajok megjelenésére az evolúció során. Mivel a faji specifikációt kielégítő új jegyek megjelenése röntgenbesugárzással volt indukálható, Muller további munkáiban intenzíven tanulmányozta a sugárzással indukált mutagenézis folyamatát. Pierre Curie (1859–1906) és Marie Skłodowska-Curie (1867–1934) rádium-226, polónium, tórium és radioaktív sugárzás különböző formáinak felfedezéséhez vezető úttörő munkássága nyomán, Otto Hahn (1879–1968), a mesothorium I és maghasadás későbbi fölfedezője, a berlin-dahlemi Vilmos Császár Intézetben 1912–14-től elindította a radioaktív sugárzások orvosi és biológiai alkalmazásának vizsgálatát. Muller 1926-ra bebizonyította, hogy a röntgensugárzás dóziséval arányosan emelkedik az indukált letális mutációk száma. Ez az észlelés már 1946-os Nobel-díja előtt világhíressé tette nevét. 1932-ben Muller Berlinbe költözik, hogy ott a Vilmos Császár Intézet Kísérleti Genetika részlegét vezető fiatal Nyikolaj Vlagyimirovics Tyimofejev-Reszovszkijjal (1900–1981) folytassa radiációs mutagenézis tanulmányait.

Muller példáját követve, Tyimofejev-Reszovszkij munkatársaival, Karl Zimmerrel (1911–1988) és Max Delbrückkel (1906–1981) 1935-ben közli az ionizáló sugárzások mutációs és kromoszóma/gén struktúrát megváltoztató hatásait összefoglaló korszakalkotó könyvüket (Timofeeff-Ressovsky et al. 1935). Tyimofejev-Reszovszkij laboratóriumát nemcsak Muller, de sok ismert fizikus (pl. Niels Bohr és Erwin Schrödinger) és genetikus is meglátogatta. Ezek között találjuk pl. Haldane-t és barátját, Cyril Darlingtont (1903–1981) a londoni John Innes Kertészeti Intézetből. Darlington igazolta a Morgan által föltételezett összefüggést a citológiailag észlelhető kiazma és rekombináció között 1932-es *Recent Advances in Cytology* című munkájában. Tyimofejev-Reszovszkijjal dolgozik rövidebb-hosszabb ideig Morgan későbbi kollégái közül Boris Ephrussi (1901–1979), a sejtorganellumok és sejtmag közötti genetikai kommunikáció későbbi fölfedezője (Ephrussi 1953); Theodosius Dobzhansky (1900–1975), aki 1937-es könyvében (*Genetics and the Origin of Species*) az evolúciót egy allél a génkészletben mutatott gyakoriságának változásával definiálta, és a magyar Györfly Barna (1911–1970), aki a mendeli öröklés morgani kromoszómaelméletén és mulleri módszerekkel indukált mutációk vizsgálatán alapuló genetikai kutatások hazai megalapítója. A sztálinizmus korszakában Morgan, Muller és Tyimofejev-Reszovszkijék munkái a genetikusok tiltott bibliájává váltak, mivel a Szovjetunió direkt politikai befolyása alatt álló országokban Trofim Gyenyiszovics Liszenko (1898–1976) lamarckista elméletét tanították és érvényesítették tüzzel-vassal. Liszenko hamisított kísérleti eredményekkel próbálta bizonyítani azt a lamarcki tézist, hogy az egyedek életük során szerzett tulajdonságai, mint pl. a természeti körülményekhez való adap-

tációs képesség, közvetlenül öröklődik az utódokban. Az atomfizikusokkal a II. világháború előtt szoros kapcsolatban álló, „imperialista darwini-morgani-mullerista” tanokat valló Tyimofejev-Reszovszkij és Zimmer viszont a szovjet atombombaprogram (saraska) szolgálatában, a Gulagban folytathatták további sugárgenetikai kutatómunkájukat 1955-ig. Tyimofejev-Reszovszkijt haláláig nem rehabilitálták. Győrffy Barnát is csak két évtizeddel elhunytá után ítélték méltónak arra, hogy a Magyar Tudományos Akadémia posztumusz levelező tagja lehessen.

A Gulag-évek briliáns terméke Tyimofejev-Reszovszkij és Zimmer biológiai találatelméletet ismertető, azonnal betiltott könyve (Timofeev-Ressovskij és Zimmer 1947), amely többek között azt a logikus felismerést közli, hogy minél kisebb sejtmagtérfoogat hordozza a kromoszomális géneket, annál nagyobb a besugárzással nyert találatok, génmutációk száma. Strasburger már 1893-ban beszámol arról, hogy a növényi hajtáscsúcs osztódó merisztéma sejtjeiben a sejt és magméret aránya stabil és fajra jellemző (Strasburger 1893), amíg Boveri szerint a magméret a magban tárolt kromatin mennyiségétől függ (Boveri 1905). Strasburger hallgatója, Friedrich Laibach (1885–1967) doktori munkájában (*Zur Frage nach der Individualität der Chromosomen im Pflanzenreich*, 1907) számos növényfaj magméretét és kromoszómaszámát vizsgálta. Azt találta, hogy a magyarul lúdfűnek nevezett *Arabidopsis thaliana* rendelkezik az egyik legkisebb magmérettel és kromoszómaszámmal ($2n=10$) a növényvilágban. Laibach 1943-ban hívja föl a *Drosophilához* hasonló növényi modellt kereső genetikusok figyelmét az *Arabidopsisszal* folytatott kutatások előnyeire (kevés kromoszóma, kis méret, nagy utódszám és rövid generációs idő) (Laibach 1943). Közleményét feltehetően Tyimofejev-Reszovszkij és Győrffy is olvasta. Tyimofejev-Reszovszkij a Lisenko-éra 1964-es megszűnte után a szibériai Obninszkban kapott radiobiológiai és genetikai laboratóriumában elkezdett *Arabidopsisszal* dolgozni. Győrffy pedig 1955-ben kér *Arabidopsis* magot Laibachtól az 1956-ban Missouri Columbiába kivándorló munkatársa, Rédei P. György (1921–2008) számára, akinek közel 30 éves úttörő munkássága döntően hozzájárult ahhoz, hogy az *Arabidopsis* 1985–86-ban végre bekerült a genetikai modellek panteonjába.

Kromoszómatörés, újraegyesülés és a kontrolláló elemek

Morgan óta a genetikai vizsgálatok alapeszközévé váló kromoszomális rekombináció folyamatának alapvető megértése Barbara McClintocknak (1902–1992) (11. ábra) köszönhető. McClintock, Marcus Morton Rhoades (1903–1991) csoportjában az ithacai Cornell egyetemen kezdte tanulmányozni a kromoszómák mitotikus és meiotikus párosodását kukoricában George Beadle-lel (1903–1989) és Harriet Creighton-nal (1909–2004) együtt. Rhoades fölfedezi, hogy kukoricában 0,5–5% gyakorisággal spontán triploid vonalak jelennek meg, amelyek az anyai meiózis hibája miatt létrejött diploid ($2n$) petesejt haploid ($1n$) pollennel való megtermékenyítéséből származnak. A triploidok meiózisa során történő kromoszómapárosodást McClintock egy általa kifejlesztett és ma is használt acetokármin festéssel vizsgálja. Megállapítja, hogy



11. ábra. Barbara McClintock (1902–1992) 1947-ben

három homológ kromoszóma gyakori trivalens párosodása mellett a meiózis első fázisában különböző $2n+x$ kromoszómaszámú aneuploid és diploid mikrospóra is keletkezik. Ezért a triploid anya diploid pollennel való keresztezéséből ritkán visszanyerhető fertilis diploid utód is (McClintock 1929). Ez az észlelés jelentős visszhangra talált a nemesítők körében. Ugyanis ismert volt, hogy triploidok előállíthatók diploid és tetraploid partnerek keresztezéséből is, de nagyfokú sterilitásuk miatt nem tűntek alkalmasnak arra, hogy a kombinált szülői jegyeket a triploidot diploid szülővel visszakeresztelve stabilizálhassák. McClintock eredményei azonban azt mutatták, hogy a triploidok keletkezése nem gátja, hanem hasznos eszköze a növényi hibridek előállításának.

Az új festési eljárással McClintock és Creighton fölfedezi, hogy egyes kukorica vonalakban a 9. kromoszóma egyik végén hordoz egy bütyökszerű struktúrát. A bütykös 9. és a 8. kromoszóma között gyakori törést és újraegyesülést, azaz reciprok transzlokációt észlelnek, ami kicseréli a 9. kromoszóma rövid karját a 8. kromoszóma hosszú karjára és fordítva. Ezek után az új bütyökkel jelölt és meghosszabbított 9. kromoszómát keresztezéssel normális hosszúságú, bütyök nélküli 9-es kromoszómával párosítják. Ez lehetővé tette, hogy a transzlokációs töréspont fölött történő rekombinációkat észleljék. A bütykös hosszú és bütyöktelen rövid kromoszómák közötti kicserélődés bütyöktelen hosszú, illetve bütykös rövid rekombináns kromoszómákat eredményezett, és ezzel a kromoszomális rekombináció (crossing over) folyamata követhetővé vált (Creighton és McClintock 1931). További munkáiban McClintock definiálja a testvér kromatidákat összekapcsoló centromér szerepét a kromoszómák

és kromatidák meiotikus elválásában. Továbbá kimutatja, hogy a kukorica 6. kromoszómája szükséges a sejttagon belül megkülönböztethető nukleolusz kialakulásához. 1931–32-től együtt dolgozik Lewis John Stadlerrel (1896–1954), aki a Missouri-Columbia Egyetemen tanulmányozza a röntgen-, radioaktív, ionizáló és ultraviola sugárzások mutációs hatásait kukoricában és árpában. Ennek során McClintock észleli, hogy a besugárzások eredményeként a kromoszómák végei letörhetnek, és körkromoszómák képződhetnek, ami jelzi a kromoszómavégek, telomérek fontosságát a kromoszómák stabilizálásában. A besugárzással kezelt fejlődő magok tápszöveiteiben a mitózis során kromoszómatörés és újraegyesülés eredményeként megjelenő színvariegáció alapján McClintock elsőként definiálja a szomatikus mutáció fogalmát. Mivel kimagasló eredményei ellenére sem kapott állandó állást Missouri-Columbiában, így volt professzora, Rhoades új, cold spring harbori intézetébe költözik. Itt folytatja a kukorica mag tápszöveiteiben, endospermiumában észlelhető, spontán megjelenő mozaikos színvariációk genetikai vizsgálatát.

Fent említett vizsgálatai során McClintock észleli, hogy a 9. kromoszóma gyakori töréséért és újraegyesüléséért felelős, disszociátornak (*Ds*) nevezett régiója környékén, a transzlokációval egy időben számos magszint befolyásoló génben is keletkezik mutáció. Azt is fölfedezi, hogy egyes kukorica vonalakban a *Ds* okozta kromoszómatörések és mutációk gyakorisága sokszorosra megemelkedik. Ennek eredményeként, McClintock azonosítani és térképezni tudta az aktivátor (*Ac*) elemet, amelynek jelenléte megemelte a kromoszómatörések és transzlokációk gyakoriságát a *Ds*-nek megfelelő kromoszomális pozícióban. Meglepetésére, a kontrolláló *Ac* elem jelenlétében a *Ds* más génekhez viszonyított (kapcsolt) pozíciója megváltozott és azzal egy időben az *Ac* eredeti kromoszomális helyzete is. Ezzel párhuzamosan McClintock azt tapasztalta, hogy az *Ac* és *Ds* új kromoszomális pozícióinak megfelelően, majd azok közelében új mutációk keletkeztek. Ez arra utalt, hogy a kromoszómákon és ritkábban azok között az *Ac* és *Ds* elemek mozognak, kivágódhatnak, és új régiókba épülhetnek az ott elhelyezkedő gének aktivitását módosítva. Ezért az *Ac* és *Ds* elemeket McClintock 1950-ben megjelent közleményében „kontrolláló elemeknek” nevezte (McClintock 1950), több mint egy évtizeddel megelőzve a hasonló, mozgásra képes transzpozonok és inszerciós elemek fölfedezését baktériumokban. Három évvel később azt is bizonyította, hogy az *Ac* és *Ds* transzpozíciójával indukált génmutációk revertálhatók, azaz az őket hordozó gének funkciója helyreállítható, ha belőlük ezek az elemek kivágódnak (McClintock 1953). Rhoades másik munkatársa, Peter A. Peterson iowai kukorica genetikus talált két másik kukorica kromoszomális lókuszt, amelyek közül az egyik a másik aktivitását szabályozta. Peterson a klorofill bioszintézist gátló mutációt okozó faktort inhibítornak (*I*), amíg a másik faktort, ami a zöld színt helyreállította enhancernek (*En*) nevezte el. Párhuzamosan, McClintock az *En* elemet szuppresszor mutátorként (*Spm*) azonosította, mivel jelenlétében a kukoricamagok vörös színe elveszett. Az *En/Spm* mutátor vizsgálatai alapján így nyilvánvalóvá vált, hogy a kontrolláló elemek kromoszomális beépülése és kivágódása más gének aktivitását mind pozitív, mind negatív módon befolyásolhatja (Peterson 2013).

Az öröklődési és evolúciós tanok matematikai szintézise és a modern genetikai módszerek gyakorlati alkalmazásai

A 20. század 30-as éveire megtörténik a mendeli öröklődés, darwini evolúciós tanok, kromoszóma, gén és mutációs elméletek szintézise. A genetika törvényeinek matematikai alapjait, a kísérletek tervezésének logikáját és eredményeinek statisztikai kiértékelését biztosító elméleti háttér megteremtése döntően Ronald Fisher (1890–1962) és munkatársai, Frank Yates (1902–1994) és Kenneth Mather (1911–1990) angol matematikusok munkásságának köszönhető. Fisher a biológia minden területén alkalmazható statisztikai módszerei (Fisher 1925), Mather mutációs gyakoriság, kapcsoltság és géntérképezés valószínűség-számítási alapelveit ismertető munkái (Mather 1938), valamint Fisher és Yates biológiai, mezőgazdasági és orvostudományi statisztikai táblázatai (Fisher és Yates 1943) a genetikai kutatások alapeszközeivé válnak. Fisher 1930-ban közli korszakalkotó munkáját, a természetes szelekció matematikai elméletét (Fisher 1930), amely összekapcsolja Mendel törvényeit a darwini természetes szelekció matematikai modelljével. Dobzhansky 1937-es *Fajok eredete és genetikája* című könyvében Fisher matematikai munkáját értelmezi számtalan példával. Ernst Walter Mayr (1904–2005) német származású biológus a darwini faj fogalmát az egyedek szaporodásra képes populációjaként definiálta, amelyeket a keresztermegtermékenyítő képesség hiánya izolált más populációktól (Mayr 1942). A modern evolúciós elmélet szintéziséhez nagyban hozzájárult a McClintock példája által inspirált amerikai citogenetikus George Ledyard Stebbins (1906–2000), aki 1935-től a kaliforniai Berkeley egyetemen Ernest Babcockkal (1877–1954) a zörgőfüvek (*Crepis*) nemzetségébe tartozó 196 faj evolúcióját tanulmányozta.

Stebbins fölfedezte, hogy a természetben gyakran spontán kereszteződő *Crepis* nemzetség sok fajában a diploid kromoszómaszám megduplázódott vagy megnégyszereződött. A többszörös, poliploid kromoszómaszámú fajokban gyakori a megtermékenyítés nélküli apomixis. Észleléseire alapozva Stebbins bevezeti a poliploid komplex elméletet (Babcock és Stebbins 1938), amely szerint a növénypopulációkban egyes fajok diploid és tetraploid formái egy időben előfordulhatnak, és spontán kereszteződhetnek más fajokkal allotetraploid, vagy azonos fajon belül autotetraploid, illetve triploid utódokat létrehozva. Stebbins és Babcock megállapítják, hogy a zárva-termők természetes populációiban a fajok közötti keresztezéssel létrejött alloplid fajok dominálnak az autotetraploidokkal szemben. Ez azt jelzi, hogy két szülő tulajdonságainak kombinációját hordozó hibridek jobban tudnak adaptálódni a változó szelektív körülményekhez. A keresztbeporzás (vagy kikereszteződés) nyilvánvalóan előnyösebb az önmegporzás vagy apomixis szaporodásformákkal szemben, amely a kevert szülői allélek feleződéséhez, illetve az anyai allélek kizárólagos öröklődéséhez vezet minden további generációban. Ugyanakkor, McClintock triploidokkal nyert eredményeit igazolva Stebbins kimutatja, hogy amíg az egyes diploid fajok közötti keresztezés lehetetlen, tetraploidok diploid, illetve tetraploid partnerekkel könnyen hibridizálhatók. A fűfélék (*Poaceae*) evolúciójának tanulmányozása során Blakeslee (1874–1954) amerikai botanikus közleményére alapozva (Blakeslee és Avery 1937)

Stebbins kolchicint, egy mikrotubulus-polimerizációt és kromoszómaszegregációt gátló szert használ diploid *Ehrharta erecta* (mohar) tetraploid változatának előállítására. Továbbá diploid és tetraploidok keresztezésével nyert steril triploidok kolchicin-kezelése során azt tapasztalja, hogy a triploid kromoszómaszám megduplázása hexaploiddá lehetővé teszi a magképzést. Ugyanakkor számos példát talál arra, hogy a meiózis teljes elmaradásával vagy az első, illetve második meiotikus osztódás hibáival keletkező diploid gamétákkal létrehozott hibridek egyes fajok esetében a diploid ősökkel nem keresztezhetőek, azaz ön-inkompatibilisek és sterilek. Ezért csak keresztbeporzással (kikeresztezással) szaporodnak, szemben más önmegporzásra képes hibridekkel. Stebbins eredményei megkérdőjelezték a faj fogalom definícióját, amely Darwin és Mayr szerint az életképes utódokat létrehozó egyedek populációját jelöli. Stebbins észlelései azt mutatták, hogy a poliploidizáció minimálisra csökkenti a diploidok és tetraploidok keresztezéséből származó utódok számát. Ugyanakkor a poliploidizáció biztosítja nagyszámú utód létrejöttét a tetraploidizált változatok ön- vagy keresztmegporzásával, ami a tetraploidok szexuális izolációját eredményezi. Ezért Stebbins a poliploidizációt az új fajok kialakulásához vezető evolúciós folyamat, a specifikáció legfontosabb faktoraként definiálja.

Stebbins számos példával illusztrálja, hogy a fajon belüli vagy fajok közötti keresztezésekkel nyert hibridek növekedése és termésátlaga meghaladja a két szülőét. Ezt a jelenséget George Harrison Shull (1874–1954) cold spring harbori genetikus kukoricánemesítési eredményei alapján hibrid vigornak vagy heterózisnak nevezi. Stebbins citogenetikai vizsgálatok sokaságával dokumentálja azt, hogy a homológ kromoszómák közötti rekombináció gyakorisága fontos szerepet játszik a hibridek stabilizálódásában. Mivel a szülők kromoszómáin öröklődő gének elrendeződése a fajok között a természetben gyakran észlelt spontán vagy indukált inverziók, transzlokációk és deléciók miatt változhat, a keresztezéssel nyert diploid, triploid vagy autotetraploid hibridek kromoszómái sokfajta átrendeződést, károsodást szenvedhetnek a meiotikus rekombináció során. Ezzel szemben az allotetraploid hibridek szülői kromoszómái egymástól függetlenül párosodnak a meiózisban, és stabil öröklődést mutatnak az utódokban. A szülői gének kölcsönhatásai miatt azonban az allotetraploid hibridekben manifesztálódó hibrid vigort okozó előnyös tulajdonságok fokozatosan eltűnhetnek utódjaikban. A heterózis során manifesztálódó jegyek instabil öröklődése alapján világossá vált, hogy a hibridekben az egyik szülőből származó gének befolyásolhatják a másik szülőből származó gének aktivitását. Stebbins keresztezéseiben észlelte, hogy a szülői gének közötti kölcsönhatás függ a hibridekben kombinált szülői kromoszómák számától, dózisától. Nevezetesen, azt tapasztalta, hogy míg egy tetraploid anya megtermékenyíthető volt egy másik diploid faj pollenjével, addig a fordított kombinációban egy ugyanazon fajból származó diploid anyanövény megporzása a másik faj tetraploid változatának pollenjével csak abortált embriókat eredményezett. A két keresztezés kizárólag abban különbözött, hogy az anyai (A) és apai (a) kromoszómák dózisa eltérő volt az embriózsák megtermékenyített központi sejtjéből kifejlődő triploid ($3n$) tápszövetben (endospermiumban): az első esetben (AAa), amíg a második esetben (Aaa). Azaz az apai kromoszómaszám megemelése a triploid

endospermium sejtekben (hasonlóan a triploid zigótákhoz) a tápszövet elhalását és az embriók abortálását okozta.

Az apai géndóizistól függő inkompatibilitás kivédésében segítettek a Roux nyomán meginduló szerv- és szövettényésztési technikák, illetve Julius Sachs úttörő növényfiziológiai kutatásai. 1904-ben Emil Hannig (1872–1955) strasbourggi botanikus beszámol arról, hogy a keresztesvirágú növények éretlen magjaiból kivágott embriók képesek steril, aminosavakat és vitaminokat tartalmazó tápoldatban növényé regenerálódni (Hannig 1904). 1927-ben Frits Warmolt Went (1903–1990) az utrecht egyetemen írt doktori dolgozatában ismerteti az auxin (indolecetsav) növényi szervek megnyúlását és gravitropikus válaszait szabályozó hormonális hatásait, egy időben Nyikolaj Grigorjevics Holodnij (1882–1953) kijevi mikrobiológussal. Az auxin kókusztej jelenlétében észlelt sejtosztódást indukáló hatásait Laibach 1925-ben felhasználja arra, hogy a *Linum perenne* és *Linum austriacum* lenfajok közötti keresztezés után elhaló embriókat megmentse és életképes hibridekké regenerálja (Laibach 1925). 1935-ben Eiichi Kurosawa és Teijiro Yabuta japán kutatók azonosítják a *Gibberella fujikuroi* gomba virágzást és virágfejlődést indukáló faktorát, a növényi gibberellin hormont, amellyel egyes későn vagy sohasem virágzó hibridek virágzása és magképzése indukálhatóvá válik. 1954-ben Folke Karl Skoog (1908–2001) és munkatársa, Carlos Miller (1923–2012) fölfedezi a kókusztej sejtosztódásért felelős faktorát, a citokinin hormont, majd másik munkatársával Toshio Murashigével kidolgozza a növényi szövettényésztéshez széles körben elterjedt Murashige–Skoog táptalajt (12. ábra). Bár haploid növényeket már 1922-ben azonosítottak *Datura* triploidok ritka utódai között (Blakelsee et al. 1922), a szövettényésztési technikák lehetővé tették haploidok reprodukálható előállítását portok szövettényészetekből. A tetraploid hibridekből így visszanyerhetővé váltak a szülők rekombinációval módosított diploid (dihaploid) kromoszómái, amelyeket föl lehetett használni más diploid partnerekkel való keresztezésekben. Ma is ezt a módszert alkalmazzák a tetraploid burgonya nemesítésében. Ugyanakkor, a kolchicin-kezelés lehetővé tette a haploid és diploid mikrospórasejtek kromoszómaszámának duplikációját. Ezzel a haplodiploidizációnak nevezett módszerrel homozigóta diploid vagy tetraploid embrió előállítása is lehetségessé vált. Az embriómentés, dihaploidizáció és haplodiploidizáció az 1890-es évektől folyamatosan fejlődő növénynemesítés alapeszközeivé váltak. További előrelépésként, 1933-ban Rhoades fölfedezi a citoplazmás hímsterilitást okozó mutációkat kukoricában, amelyekkel az önmegporzás gátolható. Ezáltal a hibrid vetőmagok előállítása egyszerűbbé és gyorsabbá válik. A citoplazmás hímsterilitás okainak későbbi tanulmányozása földeríti, hogy a kromoszómális gének mutációja öröklődően befolyásolhatja a mitokondriumok funkcióját. Ezáltal nyilvánvalóvá válik, hogy a kloroplasztiszok mellett a mitokondriumok is hordoznak tulajdonságok öröklődéséért felelős géneket.

1950-ben megjelent könyvében (*Variation and Evolution in Plants*), amely a 20. századi nemesítők egyik legfontosabb olvasmányává vált, Stebbins széles körű citogenetikai vizsgálatokkal igazolja a fajok közötti hibridizáció és poliploidizáció szerepét a növényfajok létrejöttében (specifikációjában) és evolúciójában. A kromoszóma-

szám-vizsgálatok a növénynemzetségek kialakulásának történetéről is fontos információt szolgáltatottak. Woo Jang-choon (1898–1959) hányatott sorsú japán-koreai genetikus, akinek publikációkban szereplő családneve japánul U Nagaharu, 1935-ben közli a káposztafélék nemzetségébe tartozó fajok evolúciójának citogenetikai vizsgálatát. Az U-háromszög néven ismertté vált munkájában (Nagaharu 1935) megállapítja, hogy a káposztafélék nemzetsége három ősi kromoszómakészlet kombinációjából keletkezett. Ezek a vad tarlórépából (*Brassica rapa* AA, $2n=20$), fekete mustárból (*B. nigra* BB, $2n=16$) és vadkáposztából (*B. oleracea* CC, $2n=18$, mutáns változatai a brokkoli, karfiol, karalábé, fejes, vörös és kelkáposzta, kelbimbó stb.) származtak. Ezek allotetraploid (amphidiploid) hibridjei a tarlórépa és fekete mustár keresztezéséből származó sárga mustár (*B. juncea* AABB, $4n=36$), a tarlórépa és vadkáposzta kromoszómákat hordozó repce (*B. napus* AACC, $4n=38$), és a fekete mustár és vadkáposzta hibridizációjából keletkezett etióp mustár (*B. carinata* BBCC, $4n=34$). A búza őstörténetének hasonló vizsgálatai kiderítették (Hancock 2004), hogy egyik őse a vad tönke búzával (*T. dicoccoides*) rokon egyszemű búza vagy alakor (*Triticum monococcum* AA, $2n=14$). A tetraploid kétsoros tönke vagy durumbúzafelek (*T. dicoccum* AABB, $4n=28$) az egyszemű búzából nyert örmény búza (*T. uratu* AA, $2n=14$) és a kecskebúzafelek *Aegilops searsii* vagy *Ae. speltoides* (BB, $2n=14$) őseinek hibridizációjával jöttek létre. A ma termesztett hexaploid tönköly- vagy kenyérbúza (*T. aestivum* AABBDD, $6n=42$) i. e. 6500 körül feltehetően aktív keresztezés eredményeként jelent meg, amelynek során valószínű a hidegtűrő diploid *Ae. tauschii* kecskebúza pollenjével termékenyítették meg a tetraploid *T. dicoccum*-ot, majd a létrejött triploid (ABD) spontán diploidizálódott (AABBDD) hexaploiddá.

Az 1930-as évektől a termésátlag, szárazság-, só- és hidegtűrés, valamint gomba-rezisztencia javítása érdekében megkezdődött a búza, rozs (*Secale cereale*), árpa (*Hordeum vulgare*) és zab (*Avena sativa*) szisztematikus keresztezése egymással, illetve jobb stressztűrést mutató vad rokonaikkal. A citogenetika, indukált mutagenézis és kromoszómarekombináció technikáit felhasználó növénynemesítés kimagasló eredményeit illusztrálja a Missouri-Columbia Egyetemen Stadlerrel és McClintockkal, majd Rédei-vel együtt dolgozó Ernest Robert Sears (1910–1991) munkássága (Rédei 1992). Sears fölfedezte, hogy a hexaploid búza és rozs hibridizálás eredményeként létrehozott *Triticale* (vagy *Triticosecale*; 13. ábra) nagyfokú meiotikus instabilitást mutat, ami aneuploidiát okozó kromoszóma-vesztéshez és sterilitáshoz vezet. Bár rozs anyai háttérben (citoplazmában) a hibridek stabilitása jobb volt, Sears próbált más hatásosabb módszert bevezetni idegen tulajdonságok átvitelére a hibridekbe. Ennek során fölhasználta Stadler korábbi ered-



13. ábra. *Triticale*-mező részlete (fotó: Markus Hagenlocher)

ményeit, amelyek azt mutatták, hogy a röntgen- vagy radioaktív besugárzással indukált kromoszómatorések eredményeként a hibridizáló partner egyes kromoszómaszegmentjei fuzionálhatnak búza kromoszómákkal. Így a teljes kromoszómakészlet helyett csak egy, a kívánt tulajdonságokat hordozó idegen kromoszómaszakasz genetikailag átépíthető a búza genomba. Az így keletkezett transzlokációs, részleges hibridek szelekciójára Sears és kiváló citogenetikus felesége, Lotti Sears, létrehozott egy aneuploid sort, amelynek tagjaiban egy-egy búza kromoszóma hiányzott, amelyet a transzlokációt hordozó kromoszómával lehetett pótolni. Továbbá azonosított egy olyan mutációt, amely lehetővé tette a fajok közötti allotetraploidok szülői kromoszómáinak párosodását és ezzel fertilis hibridek előállítását. Végül haploid embriók előállítására a hibridekből ő is alkalmazta a távoli vad fajokkal való megporzás technikáját. Ezzel a módszerrel a *Triticale* hibridek női ivarszervére kerülő pollen csírázását gátló (*Kr1* és *Kr2* gének által meghatározott) inkompatibilitási mechanizmust lehet kicselezni. A búzát megtermékenyítő idegen fajok (pl. kukorica vagy *Imperata cylindrica* vad fűfajta) pollenje ugyanis kicsírázik, és lenő a petesejtig. Bár azt megtermékenyíteni nem tudja, de auxin vagy kolchicin jelenlétében indukálja annak endomitózisát, amely duplikált kromoszómaszámú életképes embriók fejlődését teszi lehetővé. Az így nyert homozigóta növényben a transzlokált idegen kromoszómaszakaszokat hordozó duplikált búza kromoszómák tökéletesen tudnak párosodni, és ezért stabilizálhatók. A más fajokból a searsi technikával átvitt kromoszómaszegmentek beépülésének észlelését csak azok mérete és a citogenetika mikroszkópos módszereinek érzékenysége korlátozza.

A „zöld forradalom”

Az ellenálló képesség javítása és a műtrágyaigény, permetezési költségek és beta-karítási veszteségek csökkentése érdekében Norman Ernest Borlaug (1914–2009) (14. ábra) amerikai genetikus felhasználta az 1935-ben Japánban előállított Norin 10 búzavariánst, amely két gibberellin szintézisben hibát okozó mutáció (*rht1* és *rht2*) miatt törpe növekedést mutatott. E két gén átvitele után több százezer keresztezéssel előállított számos fokozott ellenálló és termőképességet mutató búzafajtát, amelyek használata a fejlődő országokban a termésátlagok közel 60%-os növekedéséhez, a „zöld forradalomhoz” vezetett az 1960-as években (Rajaram 2011).

A neolitikumtól exponenciálisan emelkedő népességnövekedés napjainkban már jelentősen meghaladja az élelmiszer-termelés globális kapacitását. 1927 és 2011 között az emberiség mérete 2 milliárdról 7 milliárdra nőtt. 2011-ben és 2013-ban a növekedés mértéke 78 és 75 millió volt, ami alapján várható, hogy 2025-ben 7, majd 2043-ban 9 milliárdra emelkedik a Föld lakosainak száma. 2500 kcal/nap/ember átlagos élelmiszer-fogyasztást alapul véve, 2011–12-ben a Föld lakosságának 1/8-a, 870 millió ember volt alultáplált. Bár az elmúlt 50 évben a globális mezőgazdasági termelés átlagosan 2–4%-kal növekedett évente és ezen belül a növénytermelés 3-szorosára, előreláthatóan a 2005–2007-es szinthez viszonyítva további 60% emelkedés szüksé-



14. ábra. Norman Borlaug (1914–2009) búzavonalakat vizsgál a mexikói Rockefeller Mezőgazdasági Intézetben 1970-ben, miután megkapta a Béke Nobel-díjat

ges 2050-ig az emberiség élelmiszer-ellátásának biztosítására (World food and agriculture. FAO Statistical Year Book 2013. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome).

Borlaug fogalmazza meg először, hogy a történetileg termesztett növények genetikai módosítása nélkül lehetetlen a világ exponenciálisan növekvő élelmiszer-ellátását biztosítani (Borlaug 2007).

A klasszikus nemesítés alapvető problémája, hogy az idegen kromoszómák számától, illetve kromoszómaszegmentek méretétől függően nemcsak a kívánt tulajdonságot meghatározó gént vagy géneket, hanem számtalan más ismeretlen gént is beépít a hibridekbe. Az utóbbiak esetleges negatív hatásai az általuk meghatározott tulajdonságok ismeretének hiányában csak a hibrid későbbi termesztése során jelentkeznek. A 20. század végén egy új növényhibrid előállítására átlagosan 15 évet igényelt, és azóta egy új, termesztett növényfajta előállítására szánható idő egyre kevesebb lett a népesség emelkedésével lépést tartó termésátlagok biztosítására. Ezért egyre nyilvánvalóbb, hogy a termesztett növények tulajdonságainak további javítására hatásosabb és pontosabb nemesítési módszerek alkalmazására lenne szükség. A következő fejezetben az ilyen új módszereket biztosító molekuláris biológia fejlődését követjük nyomon, és összefoglaljuk a génfunkciók megismerését és szabályozását biztosító ismeretek történeti kialakulását az 1970-es évek végéig.

Felhasznált irodalom

- Babcock Jr., E. B.–Stebbins, G. L. (1938) *The American species of Crepis: Their interrelationships and distribution as affected by polyploidy and apomixis*. Carnegie Institution, Washington.
- Bateson, P. (2002) William Bateson: a biologist ahead of his time. *J Genet* 81: 49–58.
- Blakeslee, A. F.–Avery, A. G. (1937) Methods inducing doubling of chromosomes in plants. *J Hered* 28: 393–411.
- Blakelsee, A. F.–Belling, J.–Farhnam, M. E.–Bergner, A. D. (1922) A haploid mutant in the Jimson weed, *Datura stramonium*. *Science* 55: 646–647.
- Borlaug, N. (2007) Feeding a hungry world. *Science* 318: 359.
- Boveri, T. (1905) Zellstudien V: Über die Abhängigkeit der Kerngröße und Zellenzahl der Seeigellarven von der Chromosomenzahl der Ausgangszellen. Fischer, Jena.
- Bridges, C. B. (1916) Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics* 1: 107–163.
- Bridges, C. B. (1935) Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Hered* 26: 60–64.
- Correns, C. (1905) Gregor Mendel's Briefe an Carl Nägeli 1866–1873. Ein Nachtrag zu den veröffentlichten Bastardierungsversuchen Mendels. *Abh Math-Phys Classe Kgl Sächs Ges Wiss* 29: 189–265.
- Creighton, H. B.–McClintock, B. (1931) A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. *Proc Natl Acad Sci USA* 17: 492–497.
- Crow, E. W.–Crow, J. F. (2002) 100 Years Ago: Walter Sutton and the Chromosome Theory of Heredity. *Genetics* 160: 1–4.
- Ephrussi, B. (1953) Nucleo-cytoplasmic relations in micro-organisms: their bearing on cell heredity and differentiation. Clarendon Press, Oxford.
- Finke, H. M.–Bresinsky, A.–von Denffer, D.–Ehrendorfer, F.–Magdefrau, K.–Sitte, P.–Ziegler, H.–von Lucius, W. D. (1994) 100 Jahre Strasburgers Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 1894–1994. Fischer, Stuttgart–Jena–New York.
- Fischer, R. A. (1925) Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fischer, R. A. (1930) The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford.
- Fischer, R. A.–Yates, F. (1943) Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Hamamura, Y.–Nagahara, S.–Higashiyama, T. (2012) Double fertilization on the move. *Curr Opin Plant Biol* 15: 70–77.
- Hancock, J. F. (2004) Plant Evolution and the Origin of Crop Species. CABI Publishing.
- Hannig, E. (1904) Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen-embryonen ausserhalb des Embryosacks. *Bot Ztg* 62: 45–80.
- Juel, H. O. (1898) Parthenogenesis bei *Antennaria alpina* (L.). *R Br Bot Centralblatt* 74: 369–372.
- Laibach, F. (1925) Das Taubwerden von Bastardsamen und die künstliche Aufzucht früh absterbender Bastardembryonen. *Z Bot* 17: 417–459.
- Laibach, F. (1943) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot Archiv* 44: 439–455.

- Mather, K. (1938) *The measurement of linkage in heredity*. Methuen, London.
- Mayr, E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- McClintock, B. (1929) A cytological and genetical study of triploid maize. *Genetics* 14: 180–222.
- McClintock, B. (1950) The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 36: 344–355.
- McClintock, B. (1953) Induction of instability at selected loci in maize. *Genetics* 38: 579–599.
- Nagaharu, U. (1935). Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan J Bot* 7: 389–452.
- Nogler, G. A. (2006) The lesser-known Mendel: his experiments on *Hieracium*. *Genetics* 172: 1–6.
- Ostenfeld, C. H. (1904) Weitere Beiträge zur Kenntnis der Fruchtentwicklung bei der Gattung *Hieracium*. *Ber Dt Bot Ges* 22: 537–541.
- Peterson, P. A. (2013) Historical overview of transposable element research. In: Peterson T. (ed.) *Plant Transposable Elements*. Humana Press, New York, 1–9.
- Rajaram, S. (2011) Norman Borlaug: the man I worked with and knew. *Annu Rev Phytopathol* 49: 17–30.
- Rashed, R. (ed.) (1996) *Encyclopedia of the History of Arabic Science*. Routledge, London–New York.
- Rédei, G. P. (1992) Dedication: Ernest Robert Sears (1910–1991) Geneticist par Excellence, Cytogeneticist Extraordinaire, and a Good Man. *Plant Breeding Reviews* 10: 1–22.
- Stebbins, G. L. (1950) *Variation and Evolution in Plants*. Columbia University Press, New York.
- Strasburger, E. (1893) Über die Wirkungssphäre der Kerne und die Zellgrösse. *Histol Beitr* 5: 97–124.
- Sturtevant, A. H. (1913) The linear arrangement of six sexlinked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *J Exp Zoology* 14: 43–59.
- Timofeeff-Ressovsky, N. W.–Zimmer, K. G.–Delbrück, M. (1935) *Über die Natur der Genmutation und der Genstruktur*. Weidmannsche Buchhandlung, Berlin.
- Timofeev-Ressovskij, N. V.–Zimmer, K. G. (1947) *Das Trefferprinzip in der Biologie, Biophysik*. Bd. 1. Hirzel, Berlin.
- Winkler, H. (1920) *Verbreitung und Ursache der Parthenogenesis im Pflanzen und Tierreiche*. Fischer, Jena.

2. A molekuláris biológia története a transzformációtól a genetikai mérnökségig

Összefoglalás

A fejezet a kémia és biokémia megszületésétől indulva ismerteti a géneket hordozó genetikai anyag, a DNS (dezoxiribonukleinsav) kettősspirál-modelljének megalkotásáig vezető felfedezések történetét. A DNS-ben tárolt genetikai kód RNS-sé átíródásának és a kód fehérjék aminosavsorrendjét meghatározó lefordítási mechanizmusainak ismertetése után betekintést nyerhetünk a gének szerkezetébe és a DNS-szekvencia meghatározásának módszereibe. Végül megtudhatjuk, hogy mik azok a plazmidok és a fágok, valamint megismerhetjük, hogyan lehet a géneket izolálni, feldúsítani és kifejezteni a természetes génátviteli folyamatokat felhasználó rekombináns DNS-technológia segítségével.

Summary

Starting from the birth of chemistry and biochemistry, the chapter follows the history of discoveries from the identification of DNA (deoxyribonucleic acid) as a carrier of genetic information until the construction of the DNA double helix model. After introducing the mechanisms, which transcribe the blue-print of DNA genetic code to RNA, and then determine the amino acid order of proteins by the process of translation, we gain an insight into the organization of gene's regulatory elements, as well as into methods aiding the determination of DNA nucleotide sequence. Finally, the chapter provides an introduction into molecular biology of phages and plasmids, and helps understanding how genes can be isolated, amplified, cloned and expressed using the recombinant DNA technology.

*A múlt letűnt, de a jövő ma születik.
(Kínai közmondás)*

A molekuláris biológia szerves kémiai és biokémiai alapjai



1. ábra. Friedrich Wöhler (1800–1882) német kémikus, aki először szintetizált mesterségesen szerves anyagot (karbamidot)

Mialatt Jean-Baptiste de Lamarck (1744–1829) francia biológus meggyőződéssel hirdette, hogy a környezeti hatások transzmutációval megváltoztatják az örök-lődő tulajdonságokat, vegyész kortársa, Antoine Lavoisier (1743–1794) 1789-ben éppen megcáfolta az alkimista aranycsinálók titkos tételét, miszerint a kémiai elemek transzmutációval egymásba átalakulhatnak. Az alkimisták vitalizmus elmélete szerint az élettelen (szervetlen) és élő (szerves) anyagokat az utóbbiakban lakó „életerő” különbözteti meg egymástól. Ezt az elvet, amely szerint szervetlen szervessé át nem alakítható, 1828-ban dönti meg Friedrich Wöhler (1800–1882) német kémikus (1. ábra). Wöhlernek sikerült a természetben nem, de állati vizeletben nagy mennyiségben előforduló karbamid (urea) mesterséges szintézise (Wöhler 1828). Ezt követően megindul a sejtalkotó szerves anyagok kémiai azonosítása, amelyek

alapján William Prout (1785–1850) azokat 1830-ban szénhidrátok, zsírok és fehérjék osztályaiba sorolja. Wöhler kortársa Justus von Liebig (1803–1873), Alexander von Humboldt (1769–1859) világutazó térképész-természettudós barátja fölfedezi, hogy az urea mellett az ammónia sói is kiváló növényi trágyák, amelyek hiánya gátolja a növények növekedését. A mesterséges vagy műtrágyák mezőgazdasági alkalmazását Liebig kutatásai terjesztik el, aki azt is megállapítja, hogy a növények szén-dioxidot vesznek föl, ami hasonlóan szükséges növekedésükhöz.

Johann Lambert (1728–1777) svéd és Pierre Bouguer (1698–1758) francia fizikus-matematikuskok munkái nyomán elterjednek a különböző fényforrásokat felhasználó spektroszkópiai módszerek a szerves molekulák fényelnyelési, illetve fénytörési tulajdonságainak vizsgálatában. 1849-ben Pasteur fölfedezi, hogy a borkősavnak két térszerkezeti formája van, amelyek a polarizált fény síkját különböző irányban forgatják el. Ezzel megkezdődik a sztereo-kémiai vizsgálatok fejlődése. Az első gyűrűs szerves vegyületeket (pl. benzaldehidet) az olasz Stanislao Cannizzaro (1826–1910) szintetizálja 1853-ban. 1856-ban William Perkin (1838–1907) angol kémikus elő-

állítja a váltólázat (maláriát) gyógyító kinint és az első anilin-toluidin festékeket. 1858-ban Liebig hallgatója, a német származású August Kekulé (1829–1896) kiadja a szerves vegyületeket rendszerező nagy hatású kézikönyvét (*Lehrbuch der organischen Chemie*), amellyel elindítja a vegyületek szerkezetét vizsgáló analitikai és elméleti kémiai kutatásokat.

1862-ben Louis Pasteur (1822–1895), az alkoholt, ecetet és tejsavat termelő erjedési folyamatok kutatója, csíraelméletében újra visszatér a vitalizmushoz. Pasteur úgy gondolja, hogy az erjedési reakciókért a mikroorganizmusok „életerővel bíró” fermentjei a felelősek, mivel a mikroorganizmusok inaktíválása hőkezeléssel (pasztörizálás) a fermentációt leállítja. 1897-ben Eduard Büchner (1860–1917) német vegyész bizonyítja, hogy a fermentek olyan fehérjék, amelyek akkor is működnek, ha elölt sejtkelekből vonják ki őket. Mivel a Büchner által tanulmányozott zímáz enzim bizonyult felelősnek az élesztő cukorlebontási képességéért, ami egy jól definiált tulajdonság, logikusnak tűnt az a következtetés, hogy a tulajdonságok meghatározói a fehérjék (Büchner 1897).

Büchner, a korábban többször említett svájci botanikusnál, Carl von Nägelineél és a Liebig nyomába lépő Adolf von Baeyernél (1835–1917) tanult a müncheni egyetemen. Baeyer szintetizált először indigót és fluoreszkáló fluoreszcein festékeket, fenolftaleint, sterilizáló hatású rezorcínolt és altatószerekben használt barbiturátokat. Leo Baekelanddal (1863–1944) egy időben ő készített először fenolból és formaldehidből bakelitet, az első ismert műanyagot. Baeyer munkatársa, Hermann Emil Fischer (1852–1919) 1875-ben fölfedezi az 5–7 szénatomos cukrok (pentózok, hexózok és heptózok) aldóz és ketóz formáinak epimerizációját, majd természetes növényi cukrokat, glükózt, fruktózt és mannózt szintetizál glicerinnel. Fischer azonosít először ribózt és dezoxiribózt kovalens kötésben purinszármazékokkal, adeninnel és guaninnal, valamint földeríti a kávé (koffein) és tea (teobromin) hatóanyagainak kémiai szerkezetét.

Fischer, és vele egy időben Franz Hofmeister (1850–1922) megállapítja, hogy a fehérjéket aminosavak alkotják, amelyek aminos- és karboxilcsoportjaik közötti kovalens peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Hofmeister a fehérjék kimutatására elkészíti a biuret reagenst, és tisztításukra kidolgozza a szulfát sókkal történő extrakciót, ami elősegíti a fehérjék reprodukálható kristályosítását. Fischer, Ernest Fourneau (1872–1949) francia vegyész, az első fájdalomcsillapító vegyületek fölfedezőjével együttműködve 1901-ben megszentetizálja az első peptidet, a glicil-glicint. Egy nyolctagú másik peptid elkészítése után, a kazein hidrolízisét tanulmányozva Fischer kidolgozza a fehérjék lebontásához és aminosav-összetételének megállapításához szükséges alapmódszereket (Kunz 2002).

A sejtalkotó szerves anyagok vizsgálatát segítő eszközök közül az első tejfrakcionálásra használt őscentrifugát a svájci Alexander Prandtl (1840–1896) és a braunschweigi Wilhelm Lefeldt (1836–1913) készítették el 1864–1876-ban. A svéd Carl Gustaf de Laval (1845–1913) turbinával meghajtott modern centrifugáját használja Theodor Svedberg (1884–1971) svéd vegyész, aki kidolgozza a sejt-komponensek és makromolekulák elválasztását tömegük és sűrűségük alapján növekvő koncentrációjú



2. ábra. Felix Hoppe-Seyler (1825–1895),
a biokémia egyik atyja

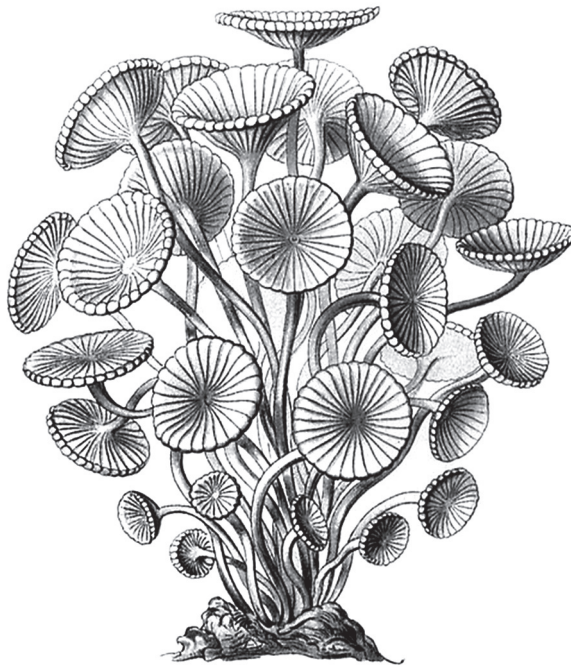
só- és cukoroldatokban (ún. gradienseken). A szerves vegyületek megtapadásában (abszorpciójában) szilárd hordozókon észlelt különbségeket először Friedlieb Runge (1795–1867) német vegyész, Johann Wolfgang von Goethe (1749–1832) barátja használta föl azok elválasztására. Runge különböző oldatokba mártott papírcsíkokon követte szénkátrányból kioldott festékek eltérő vándorlását, majd hasonló módon koffeint izolált kávéból. 1903-ban Mihail Szemjonovics Cvet (1872–1919) orosz botanikus üvegcsőbe töltött kalcium-karbonáton petroléter-etanol elegyében oldott növénykivonatok színanyagait választotta el. Ezzel a módszerrel izolálta először a fotoszintézisben szerepet játszó klorofill és karotenoid pigmenteket. 1930-ra Arne Tiselius (1902–1971) svéd kémikus kidolgozza az elektroforézis

változatos technikáit, amelyek lehetővé teszik a vegyületek elválasztását gélekben és zeolitszármozókokon különböző elektromos töltésük alapján.

A szerves kémiából Fischer munkásságát követően fejlődésnek induló új tudományág, a biokémia egyik atyja, Ernst Hoppe-Seyler (1825–1895) (2. ábra), a sejteóriát kiterjesztő berlini Rudolph Virchow (1821–1902) tanítványa. Hoppe-Seyler a tej, vér, epe és vizelet komponenseit, valamint növények pigmentjeit vizsgálta Tübingenben. Munkatársai között találjuk Paul Ehrlichet (1854–1915), az immunológia atyját, a diftéria elleni vakcinálás és a szifilisz gyógyító salvarsan fölfedezőjét. Másik kollégája, Johannes Friedrich Miescher (1844–1895) svájci biológus, aki 1869-ben fehérvérsejtek sejtmagjaiból alkalikus extrakciót követő savas kezeléssel egy addig ismeretlen fonalas anyagot izolál, amit nukleinnek nevez (Dahm 2008). Miescher azt találja, hogy szemben a fehérjékkel, a tisztított nuklein nem tartalmaz ként. Ez anynyira meglepő volt, hogy a kísérletet Hoppe-Seyler saját kezűleg azonnal megismételte. Miescher munkáját Hoppe-Seyler új strasbourgi biokémiai intézetében, Albrecht Kossel (1853–1927) és Richard Altmann (1852–1900) folytatja. Kossel és Altmann fehérjeemésztő proteázokkal tisztított nukleint készítenek, és megállapítják, hogy az foszfátot, ribózt és 2-dezoxiribózt, valamint purin- (adenin [A] és guanin [G]) és pirimidin- (citozin [C], timidin [T] és uracil [U]) bázisokat tartalmaz. Pete- és spermasejtek, állati és növénysejtek sejtmagjainak extrakciójával igazolják, hogy a sejtmag fő kémiai alkotórésze a nukleinsav.

1914-ben Robert Feulgen (1884–1955) német kémikus kifejlesztett egy festési eljárást a nukleinsav kimutatására (Kasten 2003). 1929-ben Jean Brachet (1909–1988) belga citológus Feulgen-festéssel kimutatja, hogy a korábban csecsemőmirigyből

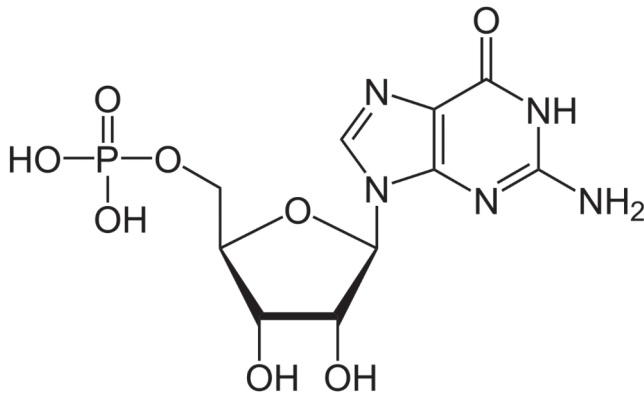
(tímuszból) izolált thymonukleinsav a petesejtek kromoszómáiban is megtalálható (Pirie 1990). 1934-ban Torbjörn Caspersson (1910–1997), a stockholmi Karolinska Intézet citológusa megállapítja, hogy a sejtmagokból izolált nukleinsav egy polimér láncmolekula (Klein és Klein 2003). 1943-ban a Berlinben dolgozó dán kutató, Joachim Hämmerling (1901–1980) *Acetabularia* zöld algában (3. ábra) fölfedezi, hogy a sejtmag mellett a citoplazma is hordoz sejtdifferenciációt irányító faktorokat. Az *Acetabularia* lábszerű rhizoidja, amely tartalmazza a sejtmagot, egy virágszerű kalapot hordoz, amit ha levágnak, képes újrakezdeni. Egy más faj eltérő formájú kalapjának átültetése után Hämmerling azt észleli, hogy a sejtmagot hordozó láb az új kalap fölveszi az eredeti eltávolított kalap formáját. Ebből megállapítja, hogy a kalap formáját meghatározó genetikai információt a sejtmag hordozza. A következő kísérletben eltávolítja a lábból a sejtmagot, és azt találja, hogy az ezek után is képes az eredeti formájú kalapot regenerálni. Megfigyeléséből azt a következtetést vonja le, hogy a sejtmag valószínűleg a citoplazmába juttat olyan morfogenezist irányító információt, amely ott stabilan megmarad, és képes fehérjék szintézisét irányítani (Harris 1982). Ezt követően Brachet azt észleli, hogy a sejtmag eltávolítása után az *Acetabularia* sejtekben csak a kloroplasztiszok mutatnak Feulgen-festést, de a citoplazma tartalmaz jelentős mennyiségű nukleinsavat. Mivel Caspersson és munkatársa, Jack Schultz már 1939-ben közzölték (Caspersson és Schultz 1939), hogy a növekedő szövetek sejt-



3. ábra. Esernyőmoszat (*Acetabularia acetabulum*) Ernst Haeckel rajzán

jeinek citoplazmája csak ribóztartalmú nukleinsavat, ribonukleinsavat (RNS-t) tartalmaz, kiderül, hogy a citoplazmikus RNS nem reagál a Feulgen-festékekkel. 1936-ban közzölt kísérleteiben Caspersson ezért nyilvánvalóan a dezoxiribonukleinsav (DNS) mennyiségét mérte Feulgen-festékekkel és ultraibolya (UV) fényforrást használó mikroszkóppal a kromoszómákban és sejtmagokban. Így született meg az a feltételezés, hogy a kromoszómák DNS-t hordoznak, amely valamilyen módon információt ad át RNS-ekre, amelyek a fehérjék szintézisét irányítják. Továbbá, Caspersson adatai szerint a DNS-tartalom a kromoszómák mitotikus osztódása során nem változik meg. Ez is támogatja azt a hipotézist, hogy a tulajdonságok öröklődéséért felelős kromoszomális gének hordozója a DNS. Végül, Brachet észlelése, hogy a kloroplasztiszok Feulgen-festődést mutatnak, összevágott Correns korábban említett genetikai eredményeivel, amelyek kimutatták, hogy a kloroplasztiszok is hordoznak anyai módon öröklődő géneket.

Koessel és Fischer volt munkatársa, Phoebus Levene (1869–1940) amerikai vegyész 1909 és 1929 között megállapítja, hogy az RNS- és DNS-molekulák gerincében foszfát kapcsolja össze kovalensen a cukrok 5' és 3' hidroxilcsoportjait, amíg a cukrok 1' szénatomján található hidroxil- (OH) csoport glükozid kötéssel kapcsolódik purin- vagy pirimidinbázisokhoz. A foszfát-cukor-bázis alapegységeket Levene nukleotidnak (4. ábra), amíg a foszfát nélküli cukor-bázis egységet nukleozidnak nevezte el. Arra a feltételezésre alapozva, hogy az RNS és a DNS egyforma arányban tartalmazza a négy különböző bázist, Levene a cukor-foszfát gerincet négy nukleotidot hordozó, tetranukleotid körmolekulaként írja le 1910-ben. Siegfried Thannhauser (1885–1962) 1928-ban egy német nyelvű enciklopédiában közli, hogy a DNS és az RNS cukor-foszfát gerincei lineáris láncmolekulákat képeznek (Thannhauser 1928). Levene már 1919-ban ismeri Thannhauser eredményeit, és korábbi modelljét visszavonja (Levene 1919). Teljesen helytelenül azonban, a nukleinsav polimereket foszfátok közötti kovalens kötéssel kapcsolódó GATC tetranukleotidok ismétlődéseként definiálja. Következtetései általános elfogadottsága miatt a dogma még 30 évig az marad, hogy



4. ábra. A guanin nukleotid kémiai szerkezete

a különböző organizmusok nukleinsavai egymáshoz hasonló ismétlődő egységekből épülnek föl, amelyek a változatos aminosav-összetételt mutató fehérjékkel szemben nem lehetnek felelősek a milliónyi öröklődő tulajdonság meghatározásáért.

Ezért nem véletlen, hogy a nukleinsavak biokémiájával ellentétben, a fehérje-biokémia a 19. század végén hatalmas tempójú fejlődésnek indul. Az elektromágneses sugárzás fölfedezését (Röntgen, 1895) és Albert Einstein (1879–1955) fotonelméletét követően, William Henry Bragg (1862–1942) angol fizikus és fia, William Lawrence Bragg (1890–1971) kidolgozzák a röntgen-diffrakció elméletét és annak alkalmazásait. Ennek segítségével a sugárzás irányát eltérítő atomok helyzete, távolsága és kapcsolatai egy kristályban megállapíthatók a kristályról készült röntgenfelvételek vizsgálatával. 1920-tól Victor Goldschmidt (1888–1947) és Linus Pauling (1901–1994, a dán Niels Bohr és osztrák Erwin Schrödinger atomfizikusok tanítványa), kidolgozzák az ionos, telített és telítetlen kovalens kötések, valamint gyűrűs szerves vegyületek röntgendiffrakciós analízisének további elméleti alapjait, amelyeket Pauling *A kémiai kötés természete* című könyvében foglal össze 1939-ben. Ezt követően elkészül számos zsírsav, lipid és biológiai festékanyag, mint pl. a hem, plasztocianin és klorofill röntgendiffrakciós szerkezeti analízise, majd 1950-ben John Kendrew (1917–1997) és Max Perutz (1914–2002) meghatározzák az első fehérjék, a mioglobinn és hemoglobin térszerkezetét (5. ábra).

A Curie házaspár felfedezései nyomán fejlődő atomfizika és radiokémia, valamint a fehérje-biokémiai kutatások előrehaladásának köszönhetően megnyílik az út az anyagcsere-folyamatok felderítéséhez is. Radioaktív vagy stabil (nehéz) izotópok alkalmazásával a metabolikus utak kiinduló, köztes és végtermékei jelölhetőkké váltak. Így az egyes anyagcsere-lépéseket katalizáló enzimek aktivitásának nyomon követésével azokat izolálni és jellemezni lehet. Az enzimológia és anyagcsere-biokémia egyik fontos állomása a cukorlebontásért felelős glikolízis folyamatának megismerése 1922-ben, amely Gustav Embden (1874–1933), Otto Fritz Meyerhof (1884–1951) német és Jakub Parnas (1884–1949) lvovi biokémikusok nevéhez fűződik. A biológiai oxidációban és energiatermelésben központi szerepet játszó citromsav ciklust Hans Krebs (1900–1981) és, az ebben a folyamatban kulcsszerepet játszó fumársav és aszkorbinsav (C-vitamin) fölfedezője, a hazai biokémiai kutatások úttörője, Szentgyörgyi Albert (1893–1986) (6. ábra) derítik föl 1930–37-ben. A szén-dioxid-fixálástól a glükóz szintéziséig vezető fotoszintézis kémiai reakcióinak, a pentóz-foszfát ciklusnak megismerése zöld algákban az 1950-es évek végén az orosz származású amerikai biokémikusnak, Melvin Calvinnak (1911–1997) köszönhető.

A transzformációtól a DNS kettős spirálig

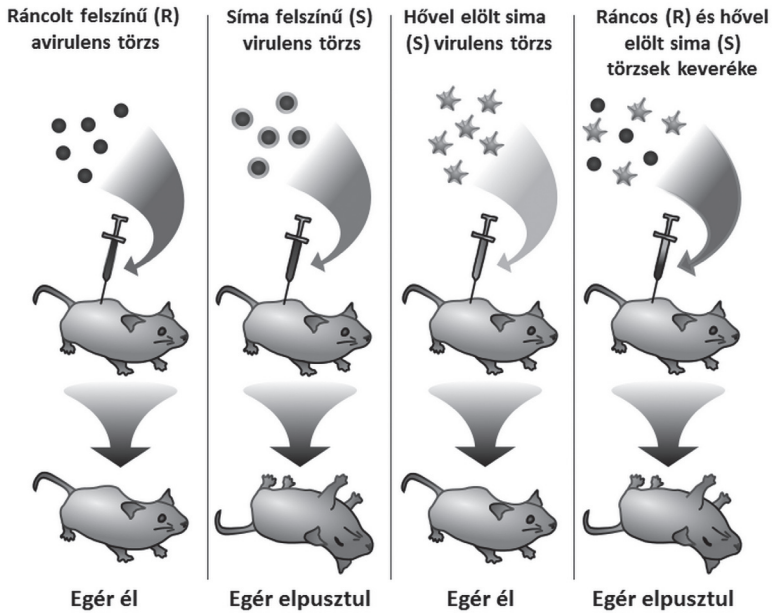
Az I. világháborút követő évek pusztító spanyolnáthajárványai miatt széles körben megindul a tüdőgyulladásért és más fertőző betegségekért felelős kórokozók mikrobiológiai vizsgálata. Frederick Griffith (1879–1941) az angol egészségügyi minisztérium laboratóriumában az ország minden tájáról összegyűjtött mintákban azonosít



6. ábra. Szent-Györgyi Albert (1893–1986) előadás közben, mögötte az általa kutatott citrátkör egy részlete látható (forrás: *Pesti Napló* képes melléklet, 1937. október 31.)

egy *Pneumococcus pneumoniae*-nek nevezett baktériumot, amely egerekbe injektálva halálos tüdőgyulladást okoz. A nyákos poliszacharid kapszulát produkáló sima felszínű (S) virulens törzsek mellett talál ráncolt felszínű, kapszulát nem produkáló (R) változatokat is, amelyek nem okoznak betegséget, hasonlóan a hőkezeléssel megölt virulens S törzsekhez. Mivel a hőkezelt S változat alkalmasnak tűnik, hogy vakcinaként felhasználják, 1928-ban Griffith végrehajt egy kontrollkísérletet. Ebben azt vizsgálja, hogy a megölt S változat ellen termelődő ellenanyagok elpusztítják-e a szervezetben előforduló avirulens R változatot is. A kísérlet eredménye meglepő volt. Az összes egér kimúlt, és bennük újra megjelent a fertőző S baktérium. Ezt Griffith azzal magyarázta, hogy a megölt S törzs valamilyen módon átalakította, transzformálta az R változatot egy, a virulencia tulajdonságért felelős faktor átadásával (Griffith 1928, 7. ábra).

Némi kételkedés után Griffith észlelését Robert Koch (1843–1910) berlini munkatársa, Fred Neufeld (1869–1945) és a Rockefeller Egyetemen dolgozó Martin Henry Dawson (1896–1945) röviddel később megismételték. Dawson, a *Pneumococcus*-szakértő Oswald Avery (1877–1955) munkatársa, a megölt S törzset kémcsőben keverte össze az R változattal, majd az S változat ellen készített ellenanyagokkal 1928–33-ban kimutatta, hogy a szaporodó R törzs transzformációja kémcsőben is megtörténik. Ugyanezt az eredményt kapta akkor is, ha az elölt S baktériumok detergenssel nyert kivonatát lúgos, majd savas kezelés után alkohollal kicsapta, és a vízben főloldott csapadékot R baktériumokkal inkubálta. Avery másik kollégája, Colin Munro MacLeod (1909–1972) ezt követően megállapította, hogy a transzformáló S faktor az R törzs három független tulajdonságát is egyszerre megváltoztatta. Következés-



7. ábra. Frederick Griffith genetikai transzformációt igazoló kísérletének vázlata (magyarázat a szövegben)

képpen, a transzformáció nem az R törzsben létrejött génmutációknak volt tulajdonítható, mivel három egyidejű mutáció valószínűsége az egyedi mutációk gyakoriságának a szorzata, ami rendkívül kis érték. Avery harmadik munkatársa, Maclyn McCarty (1911–2005) végül nukleinsavat tisztít az előlt S törzsből, azt fehérjementesíti proteázokkal, majd RNS-t degradáló RNázal kezel, és 1944-re bizonyítja, hogy a transzformációért felelős faktor valószínűleg a DNS (Avery et al. 1944; Olby 1994). Moses Kunitz (1887–1978) orosz származású biokémikus 1948-ban kitisztítja, majd kristályosítja a DNS-t emésztő DNáz I enzimet. Ezt felhasználva, az Avery-csoportban Rollin Douglas Hotchkiss (1911–2004) 1946-ban kimutatta, hogy a DNáz-kezelés gátolja a transzformációt, és hogy a transzformáló DNS 0,02%-nál kevesebb fehérjesszennyezést tartalmazott. Ezzel megerősíti azt a következtetést, hogy a tulajdonságokért felelős faktorok, a gének hordozója nem a fehérje, hanem a DNS. Az Alexander Fleming (1881–1955) által *Penicillium* gombákban 1928-ban fölfedezett első antibakteriális szer, az antibiotikum ellen kialakuló rezisztencia fölhasználásával Hotchkiss 1951-ben demonstrálja, hogy más tulajdonságok, mint pl. a sztreptomycin-rezisztencia is, átvihetők más baktériumokba. Így, a DNS jelölésére, követhetőségére Hotchkiss alkalmaz először egy antibiotikumrezisztencia-gént, amely segítségével a DNS-t felvevő baktériumok, a transzformánsok könnyen szelektálhatók, mivel életben maradnak antibiotikum-tartalmú táptalajon (Witkin 2005).

Wendell Stanley (1904–1971) amerikai biokémikus munkásságának köszönhetően kiderül, hogy az RNS is egy transzformációs képességgel rendelkező, genetikai információt hordozó nukleinsav. Stanley dohánylevél-mozaikbetegség kórokozójával dolgozik, amelyről Adolf Mayer (1843–1942) német és Dmitrij Ivanovszkij (1864–1920) orosz botanikusok korai észlelései nyomán Martinus Beijerinck (1851–1931) holland mikrobiológus deríti ki, hogy az egy porcelánszűrővel nem kinyerhető, a baktériumoknál kisebb méretű fertőző faktor, amelyet vírusnak nevez. 1935-ben Stanley a dohány-mozaikvírust (TMV-t) a fertőzött növényekből izolálta, kikristályosította, és kimutatta, hogy a kristályos vírus is fertőzőképes. 1938-ra Ernst Ruska (1906–1988) és Max Knoll (1897–1969) német fizikusok Hans Busch (1884–1973) elektronlencséit fölhasználva megépítik a Szilárd Leó (1898–1964) által megálmodott első elektronmikroszkópot, amellyel Helmut Ruska (1908–1973) közeli portrét készít a gyufaszálformájú TMV-ről. Bár már Stanley tudta, hogy a TMV egy nukleo-protein, először úgy gondolta, hogy fertőzőképességéért a burok- (kapszid-) fehérjék és nem az abban megtalálható RNS felelős. Ezt követően az Edinburgh-ban dolgozó német származású Heinz Fraenkel-Conrat (1910–1999) és munkatársa, Robley Cook Williams (1908–1995) azonban bebizonyították, hogy a kémcsőben önmagától összeálló RNS nélküli TMV fehérjekapszid nem fertőző, szemben az RNS-t hordozó kapsziddal, amely növénybe juttatása után megsokszorozódik. Ezzel Fraenkel-Conraték nemcsak megállapították, hogy RNS szükséges a vírusfehérje szintéziséhez, de azt is, hogy az RNS képes önmaga megsokszorozására, azaz replikációra. Visszatérve a TMV vírus természetét fölfedező Beijerinckhez, illendő megemlíteni, hogy ő volt az is, aki fölfedezte, hogy a pillangósvirágú növények gümőiben élő rhizóbium baktériumok felelősek a pillangósok nitrogénfixálási képességéért. Hasonlóan Beijerinck írta le először az anaerob (oxigénmentes környezetben történő) légzés biológiai oxidációs folyamatait is, amelyet pl. a szulfát redukciója biztosít a *Spirillum desulfuricans* baktériumban.

A baktériumokban szaporodó vírusok, a bakteriofágok laboratóriumi vizsgálata Frederick Twort (1877–1950) londoni mikrobiológus 1915-ben, majd a párizsi Pasteur Intézetben dolgozó Félix d’Herelle (1873–1949) 1917-ben közölt észleléseivel kezdődik. Ők fedezik föl, hogy a táptalajon növekvő baktériumok pázsitján, azokat előlve a fágok lyukakat (plakkokat) képeznek, és így könnyen szaporíthatók. A mutációs elmélet alapjait Tyimofejev-Reszovszkijjal és Zimmerrel megalkotó Max Delbrück a *Fágok növekedése* című 1937-es cikkében közli azt a felismerést, hogy a fágok tartalmaznak önmegsokszorosító örökítőanyagot, és ezért kiváló genetikai modellek, amelyek funkcióját és szaporodását indukált mutációkkal lehet tanulmányozni. Delbrück amerikai ösztöndíja lehetővé teszi, hogy 1940-ben találkozzon a Mussolini fasizmusa elől kivándorló olasz genetikussal, Salvador Luriával (1912–1991), akivel létrehozzák a legendás „fág-csoportot”. Luria és Delbrück első közös kísérletükben végleg megcáfolják azt a lamarckista elképzelést, amely szerint az egyes organizmusok az életük folyamán szerzett tulajdonságokat képesek utódjaikba átörökíteni. Kóli- (*Escherichia coli*) baktériumot növesztettek több száz kémcsőben, majd külön-külön T1 fágot tartalmazó táptalajra szélesztették Petri-csészékben. Ha a baktérium egy fágrezisztenciát szolgáltató lamarcki adaptációs képességgel rendelkezett volna, akkor minden

csőből egyforma számú túlélő baktériumot kellett volna kapni. Ezzel szemben, ebben az ún. fluktuációs tesztben, a több száz azonos tenyészetből csak egy-két Petri-csészén kaptak túlélő, fágrezisztens baktériumkolóniát. Kísérletük azt mutatta, hogy a fágrezisztencia véletlen esemény, egy baktériumgénben bekövetkező mutáció eredménye volt. Ugyanakkor, ha a baktériumokat besugározták, és ezzel indukálták a mutációk számának megemelkedését, akkor nagyságrendileg több fágrezisztens baktériumot kaptak. Ezzel nemcsak a mutációk okozta új jegyek természetes szelekciójának törvényét igazolták, de a fluktuációs teszttel kidolgoztak egy olyan módszert, az ún. mutagén tesztet, amellyel különböző vegyületek és sugárzások mutagén hatását lehetett vizsgálni (Luria és Delbrück 1943).

Delbrück munkatársa, Alfred Hershey (1908–1997) 1943-ban fölfedezte, hogy ugyanaz a baktérium megfertőzhető két fággal is, és ezért két különböző fág között a genetikai információ kicserélése tanulmányozható. Hersey és asszisztense, Martha Chase (1927–2003) 1950-ben a T2 fág megjelölésére a kóli táptalajban S^{35} kénizotópot tartalmazó cisztein aminosavat, illetve P^{32} izotópot tartalmazó foszfátot használt. Miescher eredményei alapján, amely szerint a DNS nem tartalmaz ként, kísérleteik célja az volt, hogy a kénnel jelölt fág-kapszulát alkotó fehérjék, illetve a foszforizotóppal jelölt fág-DNS sorsát nyomon kövessék a baktériumfertőzés során. A fertőzés után a baktériumok külső faláról a fágokat mechanikailag eltávolították, és azt tapasztalták, hogy a fertőzött baktériumok csak P^{32} izotópot tartalmaztak. A sugárzása alapján követhető P^{32} jelölés megmaradt a szaporodó baktériumokban egy ideig, és azok fágot is produkáltak. Hersey és Chase 1952-ben közölt adatai így újabb bizonyítékkal támogatták Avery, MacLeod, McCarty és Hotchkiss eredményeit, amelyek szerint a transzformáló ágens, az öröklődésért felelős anyag a DNS, amely az RNS-hez hasonlóan önmegsokszorozó replikációra képes (Hershey és Chase 1952).

George Beadle (1903–1989), aki McClintockkal együtt tanulmányozta a kukorica kromozómák meiotikus szegregációját, majd Sturtevanttal a *Drosophila* szemszint meghatározó gének rekombinációját, korábbi kollégája, Ephrussi hatására 1939-ben az anyagcsere-folyamatok egyes lépéseit meghatározó gének azonosításával kezd foglalkozni. Edward Tatummal (1909–1975) együtt a Stanford Egyetemen a *Neurospora crassa* kenyérgombában röntgensugárzással olyan mutációkat indukáltak, amelyek meggátolták a gomba növekedését B1- (tiamin) és B6- (piridoxin) vitaminok hiányában. Ezeket a mutánsokat a B1- és B6-vitaminszintézis folyamatában azonosított különböző vegyületeken növesztve fölfedezik, hogy a vitaminszintézisben részt vevő enzimek funkcióit különböző génmutációk gátolják (Beadle és Tatum 1941). Ennek alapján Beadle és Tatum megállapítják, hogy egy fehérje funkcióját egy gén határozza meg.

Tatum hasonló módon több aminosav és vitamin bioszintézisében hibás, auxotróf mutáns kóli törzset izolál 1946-ban. Három vagy több egymástól különböző auxotróf mutációt hordozó két kóli törzs összekeverése után Tatum és tanítványa, Joshua Lederberg (1925–2008) azt észlelik, hogy a kevert kultúrákban, a szülőkkel ellentétben, aminosav és vitamin nélkül is szaporodó baktériumok jelennek meg. Ez arra utalt, hogy a két baktériumtörzs között genetikai információcsere történt. Mivel a baktériumok összetapadása – amelyet mechanikailag (pl. nagy sebességű rázással) meg lehet

tett gátolni – szükséges volt az információcseréhez, a baktériumok közötti szexaktust konjugációnak nevezték el. Elektronmikroszkópos vizsgálatok valóban kimutatták, hogy a konjugáló baktériumokat „szexcsatornák”, ún. pílusok kötötték össze. Ezért Tatum és Lederberg föltételezte, hogy az információ átviteléért egy F „szexfaktor” a felelős, amely képes a pílusokon át a donor baktérium kromoszómájából a fogadó baktériumba juttatni olyan géneket, amelyek kompenzálják, komplementálják az anyagcserehibákat okozó mutációkat (Lederberg és Tatum 1946). A különböző mutációk komplementációja aszerint változott, hogy a donor és fogadó baktériumok kapcsolatát összekeverésük után mikor szakították meg. Ez azt jelezte, hogy a komplementáló gének átvitele a donorból a fogadó baktériumba lineáris sorrendben történt. Ezáltal azok egymáshoz viszonyított kromoszomális helyzete megállapítható volt. Lederberg továbbá észlelte, hogy az F-faktoriall át vitt gének vad alléljai és a fogadó baktérium mutáns alléljai között kicserélődés, azaz rekombináció is történik. A konjugáció során utolsóként átvitt gén jelenlétére szelektálva, a Sturtevant által bevezetett hárompontos (három kapcsolt allélt fölhasználó) térképezési módszerrel a gének közötti rekombinációs események gyakoriságát pontosan mérni lehetett. Ez lehetővé tette a szexfaktorok és baktériumkromoszómák nagy felbontású géntérképezését.

Ezt követően Lederberg tanítványai, Norton Zinder (1928–2012) és Melvin Laurance Morse (1921–2003), valamint felesége, Esther Miriam Zimmer Lederberg (1922–2006) fölfedezték, hogy *Salmonella* és kóli törzsek között fágok is képesek kromoszomális géneket átvinni, miközben a baktériumokat nem ölik meg. Ezt a folyamatot a konjugációtól megkülönböztetve, transzdukciónak nevezik el. A transzdukciós génátvitel folyamata arra utalt, hogy a fágok DNS-e képes a baktériumok DNS-ébe beépülni és onnan ki is vágódni úgy, hogy egyben a beépülés helyéhez közeli gének is becsomagolódnak a fág kapszulájába, és így átkerülnek az újonnan fertőzött baktériumgazdába. A kromoszómába beépülő fagot hordozó törzseket lizogénnek nevezik, mivel azok pázsitján nem átlátszó, hanem opálos (turbid) plakkok észlelhetők, mert a termelődő fág mennyisége kevés. Hő- vagy vegyszeres kezelés, pl. glükóz azonban indukálta a fág baktériumkromoszómából való kivágódását. Esther Lederberg 1950-ben azonosítja az *E. coli* K12 törzsében a transzdukáló lizogén λ -fagot, amely a fággenetika alapmodelljévé válik. Ezzel egy időben Hershey és Chase kísérlete világosan jelzi, hogy a fág-DNS-hez hasonlóan a szexfaktornak is egy olyan DNS-nek kell lennie, amely a kromoszomális géneket tudja mobilizálni egyik törzsből a másikba. Mivel a szexfaktor nem épül be szükségszerűen mindig a kromoszómába, hanem attól függetlenül is fennmarad, és önállóan replikálódik a baktériumban, azt extrakromoszomális elemnek, F episzómának vagy plazmidnak nevezi el Lederberg (Lederberg 1952).

Az 1950-es évek elejére a mikrobiális fág-, illetve vírusgenetika eredményeinek köszönhetően nem kérdés már, hogy a mendeli öröklődő tulajdonságokért felelős géneket hordozó anyag a kromoszómaszerkezetbe rendeződő DNS. Az is bizonyított, hogy egy gén egy fehérje szintézisét irányítja, és hogy a DNS-ben tárolt információ valamilyen módon átjut a fehérjeszintézishez szükséges RNS-re. A következő logikus kérdés ezért az volt, hogy kémiai és szerkezeti tulajdonságai alapján hogyan tárolhat a DNS utódokba öröklődő információt.

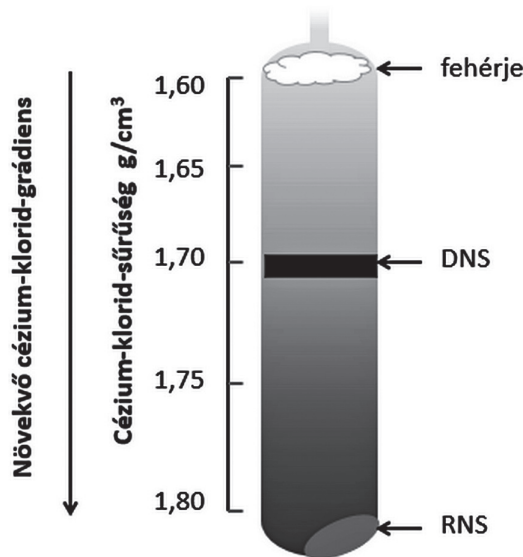
A Luria-laborban fágok röntgen-mutagenézisével foglalkozó James Watson ez a kérdés alapvetően foglalkoztatta, mivel a letális mutációk hatásainak megértéséhez nyilvánvalóan szükséges volt a DNS-ben besugárzással indukált változások jellemzése. 1950-es európai ösztöndija alatt, egy nápolyi konferencián Watsonnak alkalma volt meghallgatni Maurice Wilkins (1916–2004) előadását, aki Bragg tanítványa, John Randall (1905–1984) irányítása alatt a londoni King's College-ban tanulmányozta a DNS röntgendiffrakciós sajátosságait. Watson Wilkins előadásának hatására Angliába utazik, és ott John Kendrew cambridge-i Cavendish Laboratóriumában Max Perutz irányítása alatt Francis Crick-kel (1916–2004) a hélixszerkezetű molekulák szerkezeti modelljein kezd dolgozni. Közben Wilkins hélixstruktúrára utaló eredményeit a kolloid polimerek vizsgálatában jártas munkatársa, Rosalind Franklin (1920–1958) és hallgatója, Raymond Gosling lényegesen nagyobb fölbontású röntgenfelvételek sorával igazolta. Crick és Watson Wilkins adatai mellett Perutztól 1952-ben megkapják Franklin egyik fölvételét és számításait. Ezek azt mutatják, hogy a DNS cukor-foszfát gerince két egymással ellentétes, antiparalel 5'-3' irányban futó láncból áll, amelyet Watson és Crick megpróbál egy modellben fölépíteni. A modell építése során Watson és Crick konzultál Erwin Chargaff (1905–2002) bukovinai származású amerikai kémikussal. Chargaff, Hotchkisszal egy időben 1952-ben megállapította, hogy a különböző organizmusokból izolált DNS-ekben a nukleotidbázisok nem egyforma, hanem jellegzetesen változó arányban vannak jelen. Chargaff észlelése szerint az adenin:timidin, illetve guanin:citozin arány mindig 1:1, míg az A/T és G/C párok mennyisége a DNS típusa szerint változhat. Eközben Perutztól megkapták Linus Pauling egy kéziratát is, amelyben William Astbury (1898–1961) korábbi adatai és saját vizsgálatai alapján Pauling egy háromszálas helikális DNS-struktúrát ismertetett. Ez vezette arra Watson és Cricket, hogy a két cukor-foszfát lánchoz kapcsolódó bázisokat A:T, illetve G:C párokként kapcsolja össze egy kettősspirál- (duplex-) szerkezetben (8. ábra). Modelljükben így az egyik szálon található bázisok sorrendje egyben meghatározta a másik szál bázissorrendjét. A két szál gerincében található 5'-3' cukor-foszfát kötések ellentétes polaritása lehetővé tette az A:T és G:C bázispárosodás törvénye alapján az egyik szálról a másik szál irányított szintézisét, az információtartalom pontos és meghatározott irányú átadását. A modell így tökéletesen magyarázta, hogy a DNS-ben tárolt genetikai információ hogyan másolható és duplikálható egyik szálról a másikra, generációról generációra, követve a mendeli öröklődés binomiális alapelvét. Ezzel megszületett 1953-ban a biológia legnagyobb felfedezése (Watson és Crick 1953; Franklin és Gosling 1953).

A DNS és RNS replikációja

Watson és Crick modellje alapján a következő kérdés az volt, hogy a DNS kettős spirál szálainak másolásával keletkező új DNS-molekula a lemásolt szálaból konzervatív módon áll-e össze, avagy szemi-konzervatív módon jön létre a két duplex, amelyekben a szülői szálak az újonnan szintetizált komplementer szálakkal párosodnak. Ezt a kérdést Pauling tanítványa, Matthew Meselson és Frank Stahl kísérlete válaszolta

meg 1958-ban (Meselson és Stahl 1958). Jerome Vinograd (1913–1976) 1956-ra kidolgozott egy eljárást, amelyben a centrifugálás során kialakuló cézium-klorid (CsCl_2) koncentrációgradiens felhasználásával frakcionált borsó nukleoprotein komplexeket (9. ábra). Vinograddal konzultálva, Meselsonnak és Stahlnak sikerül N^{15} „nehéz”, illetve N^{14} „könnyű” nitrogénizotóppal jelölt DNS-mintákat molekulatömegüknek megfelelően gyorsabban, illetve lassabban ülepedő sávokként elválasztani CsCl_2 gradiensen. Ezután egy N^{15} izotópon növesztett, kb. 45 percenként duplázódó kólikultúrát N^{14} tartalmú táptalajba vitték át, majd a kultúrából 15 percenként készített DNS-mintákat hasonló módon analizálták centrifugálással. Az eredmény azt mutatta, hogy az N^{14} táptalajra vitt baktériumok DNS-ében a kólikultúra első duplikációjával egy időben eltűnt a „nehéz” N^{15} DNS sávja, és megjelent egy, a nehéz N^{15} és könnyű N^{14} DNS-ek sávjai között ülepedő köztes sáv, amely 1:1 arányban tartalmazott N^{15} és N^{14} izotópot. A kultúra második osztódásával egy időben a könnyű és köztes sávban található DNS-ek mennyiségi aránya 1:1, és bennük az N^{14} és N^{15} izotópok aránya 3:1 volt. Ez azt jelezte, hogy az első DNS-replikáció során az N^{15} -jelölt szülői DNS szálon N^{14} -tartalmú új szálak szintetizálódtak, és azok nem szeparálódtak, azaz a DNS szemi-konzervatív módon replikálódott. Ezt követően az $\text{N}^{14}/\text{N}^{15}$ -jelölt DNS-duplekxek szálain további N^{14} -jelölt szálak szintetizálódtak, ami 2 $\text{N}^{14}/\text{N}^{15}$ és 2 $\text{N}^{14}/\text{N}^{14}$ -jelölt DNS-duplekxet eredményezett.

Meselsont és Stahl megelőzve, Arthur Kornberg (1918–2007) már 1955-ben sikeresen jelölt tríciumizotópot tartalmazó (H^3) timidin fölhasználásával kóli DNS-t. Ugyanebben az évben foszforibozil-pirofoszfát és inorganikus pirofoszfát felhasználásával



9. ábra. A DNS cézium-klorid sűrűséggradiens-centrifugálással való tisztításának elve, amit először Jerome Vinograd alkalmazott

nálásával szintetizált enzimatikusan AMP-t, majd dezoxinukleotid kináz fölhasználásával előállított P^{32} izotóppal jelölt dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dATP, dGTP, dCTP és dTTP) származékokat. Ezek segítségével 1958-ban kóliból tisztított egy olyan enzimet, amely katalizálta a jelölt nukleotidok polimerizációját csecsemőmirigyből származó DNS jelenlétében (Lehman et al. 1958). Az új jelölt DNS szintéziséhez a DNS-polimeráz mellett szükséges volt egy másolható templát DNS, valamint a négy dezoxiribonukleotid jelenléte. 1959-re Kornberg megállapította, hogy a DNS-polimeráz 5'-3' irányban szintetizálja a DNS-templáton az új szálát, valamint hogy rendelkezik egy 3'-5' exonukleáz aktivitással. Ez az utóbbi funkció biztosítja a hibásan beépült bázisok kijavítását, azaz lehetővé teszi a mutagénekkel megváltoztatott bázisok kicserélését. Végül fölfedezte, hogy a DNS-polimeráz segítségével bázisanalógok is beépíthetők a DNS-be, amelyek által lehetővé válik az újonnan szintetizált szálak, illetve a velük bázispárosodó DNS-szekvenciák könnyű elválasztása és azonosítása (Kornberg 1960). 1962-re Kornberg kimutatja, hogy a T2 fág DNS-e is kódol egy DNS-polimerázt. 1965–66-ban munkatársával, a japán Reiji Okazaki-val fölfedezi, hogy a templáttal bázispárosodó, rövid oligonukleotidok (primerek) szükségesek a DNS-szintézis efficiens elindításához. Kornberg ugyanebben az évben közli, hogy a részlegesen egyes szálú DNS-szakaszok kijavításához nemcsak DNS-polimeráz, de egy új enzim, a DNS szabad 5' és 3' végeit kovalensen összekötő ligáz is szükséges.

1960-ban Delbrück laborjában Robert L. Sinsheimer és az ott dolgozó genti belga kutató, Walter Fiers izolálnak egy új kóli fágot, a Φ X174-et, majd cézium-klorid-gradiens centrifugálással kimutatják, hogy az egyes szálú cirkuláris DNS-t hordoz (Fiers és Sinsheimer 1962). 1967-ben Sinsheimer és munkatársa, Mehran Goulian, akinek a neve később összekapcsolódik a DNS-szintézisben részt vevő RNS-primerek és számos állati DNS-polimeráz enzim fölfedezésével, Kornberggel együtt a Φ X174 egyes szálú DNS-templáton *in vitro* szintetizálnak egy kettős szálú fertőzőképes fág DNS-t. Ezzel kimutatták, hogy a Φ X174 fág kettős szálú DNS köztes termék segítségével replikálódik (Goulian et al. 1967).

Sinsheimer ugyanebben az évben izolálta az MS2/f2 fágot, amely egy egyszálú RNS-t hordozó kóli vírus. Az MS2 fág replikációjának további vizsgálata során Lederberg tanítványa, Norton David Zinder (1928–2012) 1966-ban kideríti, hogy a fágfejből kóliba injektált (+) RNS-ről először különböző fehérjék szintetizálódnak, majd ezek egyike, a fág replikáz, más néven RNS-függő RNS-polimeráz szükséges egy komplementer (-) RNS-szál szintéziséhez. Ezek után a szülői (+) RNS-szál helyettesítésével a (-) szálon új (+) RNS-szálak szintetizálódnak, miközben az eltávolított (+) szülői szál degradálódik (Lodish és Zinder 1966). Ezzel az észleléssel Zinder és kollégája, Harvey F. Lodish (a *Dictyostelium discoideum* amőbával végzett fejlődésbiológiai kutatások későbbi elindítója) megmagyarázta, hogy Sinsheimer miért talált korábban csak minimális mennyiségű izotóppal jelölt szülői (+) RNS-t az MS2 fág replikációs köztes termékét képviselő dupla szálú (+/-) RNS-ben. Zinder ezzel kimutatta, hogy az MS2 RNS is szemi-konzervatív módon replikálódik.

A DNS-kód megismerése, a központi dogma és az operon-elmélet

Rosalind Franklin 1958-as korai elhunytáig Fraenkel-Conrat és Stanley csoportjával együttműködve megállapította a dohány-mozaikvírus RNS-fehérje komplexének térszerkezetét (Creager és Morgan 2008). 1960-ban Fraenkel-Conrat és munkatársa, Akira Tsugita (aki ugyanebben az évben meghatározta a TMV kapszidfehérje teljes szekvenciáját) salétromossav-mutagenézissel izolált egy legyengített dohány-mozaikvírus mutánst. Példátlanul pontos fehérjevizsgálati munkájukkal kimutatták, hogy a legyengített vírusban egy mutáció egy aminosav kicserélődését okozta (Tsugita és Fraenkel-Conrat 1960). Ezzel azt is megállapították, hogy egy aminosav kódjának megváltoztatása egy másik aminosavkód megjelenéséhez vezethet. Ezzel egy időben, Crick és barátai az „RNS nyakkendősklubjában” próbálják földeríteni, hogy a DNS-ben tárolt genetikai információ hogyan másolódik át RNS-re, és hogyan határozza meg a fehérjék aminosavsorrendjét. George Gamow (1904–1968) orosz atomfizikus (Watson 2002), Teller Ede (1908–2003) munkatársa és az ősrobbanás (Big Bang, Nagy Bumm) elmélet egyik megalkotója, Cricknek írt levelében közli, hogy a négy ismert bázisból kiválasztott bármely három bázis ($4 \times 4 \times 4 = 64$ triplet) kombinációja bőven elegendő 20 aminosav kódolásához.

1960-ra Delbrück fág csoportjában Seymour Benzer (1921–2007) a T4 fágban több mint 2400 mutációt izolált, amelyek a fág *E. coli* B törzsén túhegy méretű plakkok helyett óriás plakkokat képeztek, de egyúttal elvesztették szaporodóképességüket a K12 törzsben (Benzer 1961). Benzer fölfedezi, hogy a lízis gyorsaságáért felelős *rII* (rapid, gyors) lókuszt mutációit hordozó fágokat egymással párosítva egyes párok esetén a plakk normális vad fenotípust mutat. Azaz bizonyos mutációk komplementáltak egymást, míg más mutáns kombinációkban a plakkok mérete nem változott. Az egymást nem komplementáló *rII* mutációkat Benzer két (A és B) csoportba sorolta. Ezt követően az azonos komplementációs csoportba tartozó mutációk keresztezésével kapott ritka kis (vad) plakkok megjelenése alapján számított rekombinációs gyakoriság mérésével feltérképezte a mutációk egymáshoz viszonyított sorrendjét. A térkép azt jelezte, hogy a lízis során aktiválódó *rII* lókuszt két közösen szabályozott egységet, cisztront tartalmazott, amelyek mutációi között lehetséges volt a komplementáció. Ennek alapján Benzer megállapította, hogy az *rII* lókuszt két független fehérjét kódoló, de azonos szabályozás alatt álló gént tartalmaz. Az azonos génekbe térképezett mutációk vizsgálata során Benzer azt is észlelte, hogy ha egy gén két független mutációt hordozó alléljébe beépít egy harmadik mutációt, akkor a három mutációt hordozó fág vad típusú plakkot produkál. Ezt az észlelést használta föl 1961-ben Crick munkatársa, Sydney Brenner, aki a DNS két szála közé beépülő proflavin festéket alkalmazott mutagénként, hogy bázispár-deléciókat okozó és reverziót nem mutató mutációkat izoláljon a T4 fág *rII* B génjében (Crick et al. 1961). Elegáns kísérletek sorával bizonyította, hogy a DNS fehérjét kódoló nukleotidszekvenciája egymással nem átfedő triplet kódok sorából épül föl, amelyből egy vagy két bázis kiesése a leolvasási fázist eltolja, meggátolva funkcióképes fehérje létrejöttét.

Crick már 1955-ben föltételezte, hogy a DNS-ről egy hírvivő RNS szintetizálódik, amely templátként szolgál a fehérjék szintéziséhez. Az Albert Claude (1898–1983) által az 1930-as években bevezetett sejtfractionálási és elektronmikroszkópos módszerek továbbfejlesztésével 1955-ben George Emil Palade (1912–2008) román származású citológus fölfedezi az endoplazmatikus retikulumot és a riboszómát. Ugyanabban az évben Paul Zamecnik (1912–2009) amerikai biokémikus a fehérjeszintézis sejtbeli lokalizációját keresve, izotóppal jelölt aminosavak sorsát vizsgálja patkány májból nyert frakciókban. Azt találja, hogy röviddel fölvételüket követően azok a riboszóma-frakcióban halmozódnak föl. Mivel a dinitrofenol, amely blokkolta a mitokondriumokban az oxidatív foszforilációt, gátolta a jelölt aminosavak beépülését a riboszómákon szintetizálódó fehérjékbe, Zamecnik föltételezte, hogy ATP (adenozin-trifoszfát) szükséges a fehérjeszintézisbe belépő aminosavak aktiválásához (Hoagland et al. 1956). Zamecnik munkatársa Mahlon Hoagland (1921–2009) bizonyítja, hogy a májsejtekből készült kivonatokban a jelölt aminosavak összekapcsolódnak a jelölt ATP-vel. Továbbá azt is fölfedezte, hogy ezután ATP nélkül kovalensen kötődnek egy, a riboszómákat fölépítő rRNS-eknél jóval kisebb RNS-molekulához (Hoagland et al. 1958). 1956-ban Robert Holley (1922–1993) kóli baktériumból készült extraktumban kimutatja, hogy RNáz gátolja az izotóp jelölt alanin beépülését fehérjékbe, majd izolálja az alanint hordozó aminoacil transzfer RNS-t (tRNS-t), akkori neve szerint az oldható vagy szolubilis sRNS-t (Holley et al. 1960). Az aminosavat a riboszómához szállító tRNS fölfedezése igazolta Crick föltételezését, miszerint kell lennie egy adaptor RNS-nek, amely a DNS-ről a hírvivő (messenger) mRNS-re másolt információt felismeri a bázispárosodás törvénye szerint, és lefordítja („transzálja”) azt fehérjék aminosavsorrendjére.

A hírvivő mRNS létezésére ismét genetikai kísérletek szolgáltatnak bizonyítékot. Lederbergékhez hasonlóan, 1956-tól François Jacob (1920–2013) Élie Wollmannal (1917–2008) együtt Jacques Monod (1910–1976) laboratóriumában, a párizsi Pasteur Intézetben tanulmányozta F-faktor, illetve λ és P1 fág fölhasználásával kóliban a cukrok, vitaminok és aminosavak szintézisét befolyásoló génmutációkat. Monod doktori munkájában a tejsavas erjedést katalizáló baktériumok osztódását befolyásoló faktorkkal foglalkozott. Ennek során fölfedezte, hogy a mikroorganizmusok a hozzáférhető cukrok közül mindig először a glükózt bontják le, majd glükóz hiányában folytatják más cukrok degradálását. Mivel ebben a diauxikus (egyik tápforrásról a másikra) váltásnak nevezett folyamatban a glükóz jelenléte gátolta a laktóz (tejcukor) fölhasználását, Jacob és Wollman a laktózfölvételt és -lebontást irányító kóli génekben (*lacZ*, *Y* és *A*) izolált mutációkat. A mutáns törzsek konjugációs vizsgálatai során fölfedezték, hogy glükóz jelenlétében a *lacZ*, *Y* és *A* mutációkat nem lehetett komplementálni vad típusú alléljeikkel. Lederbergéktől kaptak egy galaktózhoz kapcsolt indolcsoportot hordozó festéket (*X-gal*), amellyel követhették a tejsavat (glükóz-galaktóz) hasító *lacZ* β -galaktozidáz enzim aktivitását a felszabaduló kék szín alapján. Ezt a tesztet fölhasználva, találtak olyan *lacI* mutánsokat, amelyek glükóz jelenlétében is termelték a β -galaktozidáz enzimet. Ezek segítségével megállapították, hogy a *lacI* mutánsban a *lacZ*, *Y* és *A* mutációk glükóz jelenlétében is komplementálhatók. Az eredmény azt

jelezte, hogy a *lacZ*, *Y* és *A* gének, hasonlóan a T2 fág *rII* lókuszában Benzer által azonosított cisztronokhoz, egy operációs egységben vagy operonban (10. ábra) közösen szabályozódnak. Jacob és Monod feltételezték, hogy a *lacI* gén által kódolt fehérje gátolja, represszálja a *lac* operonban található gének kifejeződését. Ugyanakkor azt észlelték, hogy laktóz jelenlétében a mutáns *lacI* törzsbe bevitt vad típusú *lacI*⁺ represszor nem volt működőképes. Következésképpen nyilvánvalóvá vált, hogy a β -galaktozidáz enzim szubsztrátja gátolja a represszor működését, és ezáltal aktiválja a *lac* operont. Emellett találtak olyan mutációkat, amelyek a *lacI*⁺ represszor jelenlétében is lehetővé tették a *lacZ* β -galaktozidáz enzim termelődését. Ebből következett az a föltételezés, hogy a *lac* operonon kell olyan operátor DNS-szekvenciáknak jelen lenniük, amelyek negatív módon szabályozzák a *lacZ*, *Y* és *A* együttes kifejeződését a *lacI* represszor kötése által. Végül azonosítottak olyan mutációkat, amelyek akkor is meggátolták a *lacZ*, *Y* és *A* gének működését, ha a represszort inaktiválták laktózzal vagy a *lacI* mutációval. Ez arra utalt, hogy bizonyos támogató vagy promóter DNS-szekvenciák is szükségesek a *lac* operon működéséhez. A mutációk sorrendjének térképezése földerítette a *lac* operon struktúráját, amelyben a promótert követte a represszort kötő operátor, és sorban az operon *lacZ*, *Y* és *A* fehérjéket kódoló génjei. Mivel az említett mutációk mind szabályozták az enzimaktivitása alapján könnyen követhető *lacZ* β -galaktozidáz fehérje szintézisét, logikus volt az, hogy valamilyen köztes hírvivő RNS-nek léteznie kell. Mintegy melléktermékként, Jacob és Monod 1961-es legendás közleménye azt is ismerteti, hogy különböző galaktóz- és laktózszármazékok eltérő hatásfokkal inaktiválják a *lacI* represszort (Jacob és Monod 1961). Ezért föltételezték, hogy ezek a vegyületek a *lacI* represszor térszerkezetét és DNS-kötő képességét átalakítják, azaz allosztérikusan szabályozzák. Az allosztérikus szabályozás kiemelkedő szerepét a későbbi enzimológiai kutatások fényesen igazolták. Ugyancsak a *lac* operon történetéhez kötődik a glükóz repressziót szabályozó másodlagos hírvivő, a ciklikus AMP szabályozó funkcióinak fölfedezése 1967-ben, Monod magyar származású munkatársa Ullmann Ágnes által (Ullmann és Monod 1968).

1961-ben Jacob és Brenner átutaznak Meselsonhoz Delbrück pasadénai (Caltech) laboratóriumába, hogy megismételjék Elliot Volkin (1919–2011) és Larry Astrachan 1956–58-ban közölt eredményeit (Volkin et al. 1958). Volkin és Astrachan azt találta, hogy T2 és T7 fágfertőzést követő első 20 percben az *E. coli* K12 törzsben nagy mennyiségű P³² izotóppal jelölt RNS termelődik, amelynek bázisösszetétele megegyezik a



10. ábra. Egy átlagos operon felépítése. Az operon a DNS egy regulációs egysége, amely egy promóter és egy operátor szakaszból, valamint rendszerint több fehérjekódoló génből áll. Az operon működésének köszönhetően koordináltan szintetizált fehérjék jellemzően egy adott feladat elvégzéséhez szükségesek (pl. a laktóz szintéziséhez)

fág DNS-ek bázisösszetételével (uracilt timidinnek megfeleltetve). Brenner, Jacob és Meselson a recipiens sejtek riboszómáit nehéz N^{15} és C^{13} izotópokkal jelölték, majd a T4 fágfertőzés előtt P^{32} izotópot adtak, és 7 percet követően a sejteket összekeverték 50-szer nagyobb mennyiségű N^{14} , C^{12} és P^{31} izotópon nőtt sejtekkel. A nehéz és könnyű riboszómákat cézium-klorid-gradiens elválasztva azt találták, hogy a P^{32} -jelölt RNS, amely a fág DNS-hez hasonló bázisösszetételt mutatott, az N^{15} és C^{13} izotópokkal jelölt nehéz riboszómákkal együtt ülepedett. Ugyanezt a kísérletet megismételték úgy, hogy az RNS helyett a nehéz N^{15} és C^{13} izotópokkal jelölt fágfertőzött sejteket kén S^{35} izotóppal jelölték, amíg a kontroll sejtek N^{14} , C^{12} és S^{32} izotópon nőttek. Az RNS-hez hasonlóan, az újonnan szintetizált S^{35} -jelölt, fág RNS által kódolt fehérjék is a nehéz N^{15} és C^{13} izotópokkal jelölt riboszómákkal együtt ülepedtek. Ezzel lényegében bizonyították, hogy a fág DNS-ről RNS, majd fehérje szintetizálódott a riboszómákon (Brenner et al. 1961).

1961-ben Meyerhof korábbi tanítványa, a spanyol származású Severo Ochoa de Albornoz (1905–1993) és munkatársa, Marianne Grunberg-Manago (1921–2013) *Azotobacter vinelandii* baktériumból izoláltak egy polinukleotid foszforiláz/reduktáz enzimet, amely lehetővé tette poliribonukleotidok kémcsőbeli szintézisét ribonukleotid difoszfátokból. Ezt az enzimet használta föl poliuracil szintézisére Marshall Nirenberg (1927–2010, NIH, Bethesda) és kollégája, Heinrich Matthaei bonni biokémikus, valamint Ochoa munkatársa, Lengyel Péter (aki Straub F. Brunó tanítványa volt, majd 1956-ban kivándorolt New Yorkba) és Joseph F. Speyer (1926–1998, aki 1939-ben hagyta el a hitleri Németországot). Nirenberg tisztított kóli riboszómákhoz adott jelölt aminosavakat, amelyeket Holley módszere szerint enzimmal kapcsolt a tisztított tRNS-ekhez. Lengyel, Zamecnik módszerével tisztított patkánymájából riboszómát és kóli extraktumot használt az aminoacil tRNS-ek előállítására. Poliuracilról mindkét *in vitro* translációs rendszerben jelölt polifenilalanin szintetizálódott a riboszómákon jelezve, hogy a fenilalaninért felelős kód az UUU triplet (Lengyel et al. 1961; Nirenberg és Matthaei 1961). Ezt követően különböző arányokban kevert kétfajta ribonukleotid difoszfátból szintetizáltak polimereket, és a létrejött tripletek (pl. AAA, AAU és UAA, AUU és UUA, AUA és UAU) arányának megfelelően változó aminosav-összetétel meghatározásával folytatták a fehérjekód föltörését, egy év alatt több mint 40 cikket közölve.

Har Gobind Khorana (1922–2011) zseniális indiai származású vegyész 1960–61-ben kidolgozta az oligo- és poliribo-, illetve dezoxiribonukleotid-szintézis és -lebontás módszereit (Khorana 1960). Nirenberg munkatársa, Philip Leder fölfedezte, hogy az *in vitro* translációs reakcióban a riboszóma a jelölt tRNS-sel együtt izolálható, ha mRNS-ként használt oligo- vagy poliribonukleotid jelen van. Leder továbbá azt észlelte, hogy egy ribonukleotid triplet is elegendő a riboszóma-tRNS komplex stabilizálásához. Ennek alapján kidolgozott egy nitrocellulóz filterkötési eljárást, amelyben a jelölt tRNS-riboszóma komplexek csak akkor maradtak fenn a filteren, ha a riboszómán a ribonukleotid triplethez kötődött a jelölt aminosavat hordozó tRNS (Leder és Nirenberg 1964). Khorana csoportja hasonló módszert használt két, három, illetve négy nukleotidisméltódést hordozó mRNS-ek translációjára, amely egyben megen-

gedte a stopkodonok azonosítását is (Khorana 1965). Az aminosav-kódszótár meghatározása mellett ezek a kísérletek azt is kimutatták, hogy a riboszóma az mRNS-ben kódolt triplet információt 5'-3' irányban olvassa le.

Az, hogy az aminosavak közötti peptidkötés milyen irányban történik meg, Howard M. Dintzis kísérleteiből derült ki 1962-ben (Naughton és Dintzis 1962). Mivel szintézisük során a fehérjék a riboszómákkal együtt izolálhatók, Dintzis vörösvérsejtekkel készített transzlációs rendszerben tanulmányozta C^{14} -arginin beépülését a riboszómák szintetizálódó hemoglobin fehérjébe, különböző jelölési időket használva. Vizsgálataiban fölhasználta Frederick Sanger (1918–2013) proteázemésztésen és aminosoportok fluoro-dinitrobenzol jelölésén alapuló módszerét, amellyel Sanger már 1951–55-ben meghatározta a cukorérzékenységet szabályozó inzulin hormon A és B láncainak aminosavsorrendjét (Sanger 1959). A riboszómákban a félig kész hemoglobinmolekulák C-terminális végén jelent meg először a C^{14} -arginin jel, majd hosszabb inkubációs idő után az izotóp beépülése az N-terminushoz közelebbi hemoglobin peptidekben is észlelhető volt. Ez azt mutatta, hogy a félig kész hemoglobinmolekulák N-terminusa már megszintetizálódott, amikor a C-terminusba még beépíthető volt C^{14} -arginin. Ennek alapján Dintzis megállapította, hogy a transzlációba belépő új aminosav aminosoportja az előző aminosav karboxilcsoportjával képez peptidkötést.

Sanger első inzulinszekvenciái már jelezték, hogy minden fehérje egy kezdő formil-metionin-csoportot hordoz. Sanger és Kjeld Marcker 1964-ben izolálták a formil-metionin tRNS-t, és megállapították, hogy az az ATG start kodont ismeri föl az mRNS-ekben (Marcker és Sanger 1964). 1967-re a Sanger-csoport meghatározta a kóli riboszóma rRNS-ek közül a legkisebb 5S RNS szekvenciáját is (Brownlee et al. 1967). Végül, a transzláció folyamatának teljes megértéséhez döntően hozzájárult, hogy Holley és munkatársai 1964-re meghatározták az alanin tRNS teljes szekvenciáját és annak lóhere formájú térszerkezetét, amelyben megtalálták az aminosav kodonnal párosodó komplementer triplet szekvenciáját (Holley et al. 1965a, b). Ezzel 1966-ra ismertté vált, hogy a fehérjeszintézis során az mRNS aminosav kodonjai és a tRNS-ek által hordozott komplementer tripletek (antikodonok) párosodnak. Így, a bázispárosodás törvényei alapján az mRNS-ben tárolt információ a tRNS-ek segítségével irányított módon meghatározza a szintetizálódó fehérjékbe beépülő aminosavak sorrendjét.

A kódszótárban 61 kodon felel meg 20 aminosavnak, a további három triplet (UAA, UGA és UAG) stopkodon. Az azonos aminosavat kódoló tripletek első két nukleotidja mindig azonos, míg a harmadik változhat. Ennek alapján Crick 1966-ban megállapítja, hogy bizonyos aminosavak esetén a kodon degenerált és „lötyög” (Crick 1966). Ennek egyik következménye az, hogy a kodon harmadik nukleotidját más nukleotidra kicserélő „csendes” mutációk ugyanannak az aminosavnak egy másik kodonját hozhatják létre, és ezért a fehérje szekvenciája ilyen mutációk esetén nem változik.

A DNS-ről mRNS-t szintetizáló RNS-polimeráz enzim fölfedezése és tisztítása nehezebbnek bizonyult, mert az izotóppal jelölt ribonukleotidok, különböző enzimeknek (pl. poliA-polimeráz, CCA tRNS nukleotidil-transzferáz stb.) köszönhetően, DNS templát hiányában is beépültek RNS-molekulákba. Egy évtized munkája után, vé-

gül 1961-ben Jerard Hurwitz New York-i laboratóriuma Khoranától és Kornbergtől kapott polidezoxiadenin és polidA-dT templatokon egy részlegesen tisztított enzim segítségével kimutatta poli-uridin és poliA-U szintézisét *in vitro* (Furth et al. 1961). Ugyanebben az évben Samuel B. Weiss, Audrey Stevens és Paul Berg csoportjai is beszámoltak az RNS-polimeráz enzim tisztításáról.

1962-ben Berg csoportja kimutatta, hogy kétszálú Φ X174 DNS-ről minkét szál átírható RNS-sé, és az RNS termék nem marad a DNS-hez kötve DNS-RNS hibridként, azaz a DNS templat az átírás után is megtartja kettős szálú spirál szerkezetét. Ezzel Berg laboratóriuma bizonyítja, hogy szemben a DNS szemi-konzervatív replikációjával (ahol a szülői szál együtt marad az újonnan szintetizált szállal), az RNS konzervatív módon (a DNS-szálakat elhagyva) másolódik le a bázispárosodás törvényének megfelelően a DNS-ről (Chamberlin és Berg 1962). Innen ered a trasz-szkript, transz-írás és a transzkripció elnevezés is.

Ezzel lényegében bizonyítottá vált a genetika „központi dogmája”, amely szerint a DNS-ben tárolt információ a transzkripció folyamata során egy DNS-függő RNS-polimeráz által 5'–3' irányban komplementer hírvivő mRNS-re íródik. Ezt követően az aminosavkódot hordozó mRNS tripletek bázispárosodása 5'–3' irányban az aminosavakkal töltött tRNS-ek komplementer antikodonjaival irányítja a riboszómákon az N-terminális formil-metionin ATG kodonjától a C-terminális aminosav helyzetét definiáló stopkodonok irányában a fehérjék szintézisét. Az információ átvitele az utódokba a DNS, illetve RNS szemi-konzervatív replikációjával történik. Ezt a Crick által „központi dogmának” nevezett elvet egészítette ki David Baltimore (Massachusetts Institute of Technology, MIT), Howard Temin (1934–1994) és Satoshi Mizutani (Wisconsin-Madison Egyetem) felfedezése 1970-ben, amelyben megállapították, hogy a rágcsáló leukémia (R-MLV) és Rous szarkóma (RSV) tumorvírusok RNS-ei kódolnak egy RNS-függő DNS-polimerázt (reverz-transzkriptázt), amely a vírus RNS-ről DNS-t szintetizál, ami ezt követően beépülhet a gazda kromoszómába (Baltimore 1970; Temin és Mizutani 1970). Azaz, az információátvitel RNS-ről DNS-re is lehetséges. Ezzel szemben semmilyen bizonyíték nem utal eddig arra, hogy információ továbbítódna fehérjékről DNS-re vagy RNS-re.

Rekombináns DNS-technológia

Amint eddig láttuk, az 1960-as évek végére a génekben tárolt információ megismeréséhez rendelkezésre álltak a DNS és RNS szintéziséhez és lebontásához szükséges enzimek, *in vitro* fehérjetranszlációs rendszerek, oligonukleotid, peptidszintézis, izotópjelölési, sejtfractionálási, enzimológiai, valamint az anyagcsere-folyamatok feltárását és fehérjék kimutatását segítő analitikai és immunológiai módszerek, és az RNS nukleotid- és fehérjék aminosavsorrendjét meghatározó szekvenálási technikák. Először természetesen a fág-, vírus- és baktériumgenetikáival foglalkozó csoportok – amelyekben az említett korszakalkotó fölfedezések és azokat elősegítő új technikák megszülettek – léptek át a molekuláris biológiai kutatások új korszakába.

1959–62-ben Julius Marmur (1926–1996) a Harvard Egyetemen fág, baktérium és csecsemőmirigy DNS-ek hődenaturációjának vizsgálata során megállapítja, hogy különböző DNS-ek változó GC:AT tartalmuknak megfelelően eltérő hőmérsékleten „olvadnak meg”, alakulnak át kettős szálú formából egyes szálú formába, amely megemeli 260 nm-es UV-fény-abszorpciójuk értékét (Marmur és Doty 1962). Ezt az észlelést használták föl 1968-ban Roy John Britten (1919–2012) és kollégái, hogy fragmentált DNS-szekvenciákat válasszanak el egymástól különböző hőmérsékleten észlelt kiolvadásuk, denaturálásuk alapján. Ezt az tette lehetővé, hogy az egyszálú DNS cellulóz, nitrocellulóz vagy hidroxilapatit hordozókon egyszerűen elválasztható a kettős szálú DNS-fragmentektől. A szálevválasztás után a hőmérsékletet fokozatosan újra csökkentve a három hidrogénkötéssel kapcsolódó GC párokat tartalmazó DNS-szakaszok gyorsabban bázispárosodnak (reasszociálnak vagy hibridizálnak) ismét kettős szálú DNS-sé. Britten és csoportja 1968-ra baktérium, kovamoszat, Euglena, növény, állati és emberi DNS-ek összehasonlító vizsgálata alapján megállapítják, hogy a magasabb rendű (eukarióta) organizmusok kromoszómáiban rendkívül sokfajta ismétlődő, ún. repetitív DNS-szekvencia halmozódott föl az evolúció során (Britten és Kohne 1968).

Fiers és Sinsheimer sikeres Φ X174 DNS izolálási kísérlete nyomán, 1960-tól a Vinograd által kifejlesztett CsCl_2 egyensúlyi centrifugálás általános analitikai és preparatív módszerként elterjed a cirkuláris és lineáris DNS-molekulák vizsgálatában. Hershey ezzel a módszerrel tisztítja 1963-ban a λ -fág DNS-ét, majd kimutatja, hogy a fág DNS-t egy „ragadós vég”, két egymással átfedő, bázispárosodó rövid egyszálú DNS-szakasz kapcsolja körre, amely hőkezeléssel szétválasztható (Hershey és Burgi 1965). A DNS-denaturálás/-renaturálás technikáját alkalmazva fehérjefilmre rétegzett DNS heteroduplexek készíthetők, amelyekben a deléciók/inszerciók nagysága és helyzete mérhető a Kleinschmidt és Zahn által 1959-ben kidolgozott elektronmikroszkópos technikával (Kleinschmidt és Zahn 1959). 1963-ban John Forster Cairns angol genetikus izotóppal jelölt DNS-t rétegzett filmmemulzióra, majd autoradiográfiával láthatóvá tette a kóli körkromoszómán haladó replikációs hurkokat. Egyben igazolta Jacob és Wollman genetikai térképezési eredményeit, amelyek azt mutatták, hogy a kóli genom cirkuláris (kör alakú) (Cairns 1963).

1963-ban Vinograd bevezeti a lúgos CsCl_2 gradiens DNS-ülepítési módszert, amely azon alapul, hogy a DNS két szála nemcsak melegítéssel, de lúgos kezeléssel is elválasztható. Szemben a λ -fág DNS-ével, a kovalens kötéssel cirkularizált DNS-molekulák nem kitekerhetők (denaturálhatók) sem lúggal, sem hővel, és ezért gyorsabban ülepednek a CsCl_2 gradiensben. Vinograd, valamint Luria és Delbrück tanítványai Renato Dubelcco (1914–2012) és Marguerite Vogt (1913–2007), akik a bakteriofág genetikáról átváltottak humán tumorvírusok kutatására, alkalikus gradiens centrifugálással kimutatják, hogy a polyoma PY vírus kettős szálú cirkuláris DNS-t hordoz (Dulbecco és Vogt 1963; Weil és Vinograd 1963). Vinograd azt is fölfedezi, hogy a cirkuláris polyoma DNS két sávban ülepszik. Egyikben szuperzsavarodott (szuperhelikális), a másikban nyitott cirkuláris vírus DNS-molekulákat talál elektronmikroszkópos vizsgálatokkal. Ennek alapján megállapítja, hogy a DNS-spirál magasabb rendű struktú-

rákat képez, amelyek fölbonthatók, relaxálhatók, ha a cirkuláris DNS-molekula egyik szála törést szenved. Ez megnyitotta az utat az egyszálú törést, majd újraegyesülést katalizáló topoizomeráz enzimek tisztításához, amelyek közül az elsőt (DNS-girázt) James C. Wang azonosította kóliban 1971-ben a Berkeley egyetemen (Wang 1971). Innen indulnak a DNS-topológia további kutatásai, amelyek később földerítik, hogyan szabályozódik a DNS kitekeredése az RNS-szintézis és DNS-replikáció során, illetve hogyan szerveződik a DNS a kromoszómákat alkotó kromatinfonalakba.

1963-ban Pauling tanítványa, Leonard Solomon Lerman (1925–2012) felderíti a DNS két szála közé beépülő (interkalálódó) és replikációt gátló fluoreszcens festékek (pl. ethidiumbromid) hatásmechanizmusát (Lerman 1963). 1967-ben Vinograd kimutatja, hogy az ethidiumbromid beépülése a DNS-be lecsökkenti a lineáris és nyitott cirkuláris formák sűrűségét, és ezáltal a szuperhelikális körbezárt DNS-ek könnyen izolálhatók ethidiumbromid-CsCl₂ sűrűségi-egyensúlyi gradiens centrifugálással (Radloff et al. 1967). Ennek fölhasználásával számos humán vírus (pl. SV40, papilloma, polyoma stb.), bakteriófág (λ , M13, P22 stb.) és mitokondrium DNS kinyerése után, 1967-ben Donald R. Helinski (UC San Diego) azonosítja az első cirkuláris plazmid DNS-t *Proteus mirabilis*-ben, amely felelős az enterobakteriumokat megölő bakteriocid colicin E1 termeléséért (Roth és Helinski 1967). Ezután kimutatja, hogy a kóli kromoszómába a triptofán operon közelébe beépülő, majd onnan azt konjugációval mobilizáló ColVB szexfaktor is egy cirkuláris plazmid, amely hordozza a T1 fág érzékenységeért, colicin V és B toxinok termeléséért, valamint triptofán és cisztein aminosavak bioszintéziséért felelős géneket (Hickson et al. 1967). Ezzel egyben demonstrálja, hogy a genetikai módszerekkel plazmidokba vitt kromoszomális gének feldúsíthatók és izolálhatók, azaz a plazmidok természetes génátviteli vektorként alkalmazhatók.

1960-ban japán kutatók beszámolnak olyan R szexfaktorok létezéséről, amelyek többszörös antibiotikumrezisztencia-gént hordoztak, és képesek konjugációval kromoszomális géneket más baktériumba átjuttatni (Akiba et al. 1960). Már Hotchkiss sztreptomycinrezisztencia-gént felhasználó kísérletei óta közismert, hogy sokkal egyszerűbb és hatásosabb antibiotikum-rezisztenciára szelektálni a konjugáció vagy transzformáció során, mint a bakteriocinok termelésére, amely speciális törzsek alkalmazásához kötött. Ezért Helinski, Stanley Norman Cohen (Stanford Egyetem), Stanley Falkow (Seattle, Stanford), Naomi Datta (1922–2008, London) és sokan mások több tucat R plazmidot jellemeznek 1966 és 1970 között. Cohen 1972-re kifejleszt egy kalciumkezelést és rövid hőshokot alkalmazó módszert, amellyel kóliba transzformálja a többszörös antibiotikum-rezisztenciát hordozó R64-11 és R6-5 plazmidok DNS-ét (Cohen et al. 1972). Ugyancsak 1972-ben közli, hogy mechanikusan fölshabdalt R6-5 DNS cukorgradiensén szétválasztott fragmentjeit kóliba transzformálva sikerült elkészíteni egy sokkal kisebb tetraciklinrezisztencia-gént hordozó plazmidot, a pSC101-et. Ezzel kimutatta, hogy kis gyakorisággal bár, de a lineáris DNS-fragmentek egymással összekapcsolódnak, ligálódnak kóliban. Azaz a plazmidok replikációjáért felelős DNS szakaszai összeépíthetők más DNS-fragmentek által hordozott rezisztenciagénekkel, és ezáltal új rekombináns plazmidok készíthetők (Cohen és Chang 1973).

A DNS-t hasító enzimek kutatását Luria és Giuseppe Bertani 1952–53-as megfigyelései indítják el, amelyek azt mutatták, hogy a kóli C törzsön szaporított λ -fág kb. egymilliomod része képes csak kóli K törzsön szaporodni. Lederberg és Meselson, valamint Werner Arber svájci genetikus ezt a gátló „restrikciós” aktivitást a λ -fág DNS degradálásának tulajdonították már 1962–64-ben. 1968–69-ben tisztítják ki a K törzsből a restrikciós aktivitásért felelős I-es típusú restrikciós endonukleázt, amely ugyan specifikus szekvenciát ismer föl, de a DNS-t véletlenszerűen hasítja (Meselson és Yuan 1968; Arber és Linn 1969). 1979-ben Hamilton O. Smith és munkatársai két új, II-es típusú restrikciós enzimet (HindII és HindIII) tisztítanak *Haemophilus influenzae*-ből (Smith és Wilcox 1970). Kathleen Danna és Daniel Nathans kollégáik a Johns Hopkins Egyetemen (Baltimore) fölfedezik, hogy a hat nukleotidot fölismerő HindIII enzim a cirkuláris SV40 DNS-t csak néhány fragmentre hasítja. A HindIII felhasználásával elkészítik az SV40 DNS restrikciós fragmentekből összeállított fizikai térképét, amely a DNS méretét kilobázispár (kb) egységekben mutatja (Danna és Nathans 1971). A DNS-fragmenteket méretük szerint kezdetben a fehérjék és RNS elválasztásához használt poliakrilamid gélelektroforézissel szeparálják (Loening 1967). Ezt a módszert 1977-ben fölváltja a ma is használt ethidiumbromidot tartalmazó agaróz lap elektroforézis technika, amellyel a DNS-fragmentek UV-fényben láthatóvá tehetőek, és egyszerű elektroelúcióval a gélből izolálhatók (McDonell et al. 1977).

1973-ban három amerikai laboratórium közli rekombináns plazmidok elkészítését. Ezt nagyban elősegíti, hogy R. N. Yoshimori, Herbert W. Boyer PhD-hallgatója 1971-ben kitisztítja a kóli RY13 törzsből a második ismert restrikciós enzimet, az EcoRI-et. Paul Berg és munkatársai egyetlen EcoRI helyet azonosítanak az SV40 vírus DNS-ében. Az SV40 EcoRI hasítóhely 3' végein egyszálú oligo-dA szakaszokat szintetizálnak borjú csecsemőmirigyből izolált terminális transzferáz enzimmal. Ezek után izolálják a transzdukáló *λdvgal* fág DNS replikációs origóját és a galaktóz operonját hordozó EcoRI fragmentet, majd hasonlóan meghosszabbítják annak 3' végeit oligo-dT szintézisével. A két DNS-t, az oligo-dA és oligo-dT szakaszaik bázispárosodása után összekapcsolják DNS-ligáz-kezeléssel. Így elkészítenek egy rekombináns SV40 vírust, amely hordozza a galaktóz operont és a *λdvgal* fág néhány génjét (Jackson et al. 1972). Peter Lobban és Armin Dale Kaiser két P22 fág DNS-molekulát kapcsol össze hasonló módszerrel (Lobban és Kaiser 1973). Végül Cohen és munkatársai az általuk korábban izolált (Cohen és Chang 1973) kis, tetraciklin-rezisztenciát hordozó pSC101 plazmid egyetlen EcoRI helyére, a hasítóhely ragadós végeit DNS-ligázzal zárva, beépítik az R6-5 plazmid számos EcoRI fragmentjét. Egy neomicin- és szulfonamidrezisztencia-géneket hordozó EcoRI fragment beépítésével így elkészítenek egy új vektort más DNS-fragmentek hasonló módon történő feldúsítására, klónozására (Cohen et al. 1973).

Az 1973-ban megszülető rekombináns DNS-technológia óriási távlatokat nyitott meg a molekuláris biológiai kutatások előtt. A gének fizikai térképhezértének meghatározása után bármely gén DNS-ét a klónozási technikával föl lehetett dúsítani és szekvenciáját meghatározni. A gének kódoló régióit kombinálni lehetett más gének promotereivel különböző génexpressziós vektorokban, hogy azokról

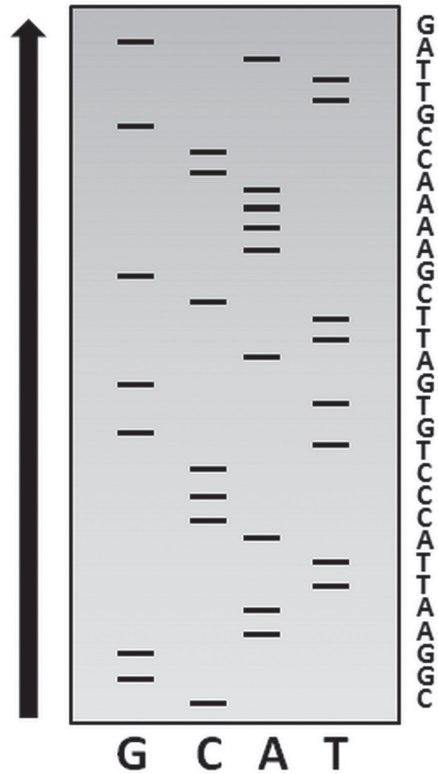
pl. laktóz-indukálható módon kóliban fehérjét lehessen szintetizálni. A Berg-labor által kifejlesztett oligo-dT és oligo-dA meghosszabbítási technika lehetővé tette a poliA végeket hordozó eukarióta mRNS-ekről reverz-transzkriptázzal nyert komplementer cDNS-ek plazmidokba építését és az általuk kódolt fehérjék szabályozható szintézisét kóliban, illetve más baktériumokban, valamint később élesztőben és tenyésztett állati vagy humán sejtekben. Továbbá két gén kódoló régióit kombinálni lehetett úgy, hogy a hibrid gén által kódolt fúziós fehérje a címkézésre használt fehérjét fölismerő ellenanyaggal követhető legyen. És még milliónyi más lehetőség reálisnak látszott, mint pl. új rákgyógyszerek, hormonok, hatóanyagok, diagnosztikai módszerek stb. kifejlesztése, amelyek hamarosan meg is valósultak, újabb és újabb fölfedezések előtt ajtót nyitva a molekuláris biológiai kutatásokban. Ugyanakkor a rekombináns DNS-technológia azonnal üzleti és pénzforrássá vált. Cohen és Boyer a technológiát 1980-ban sikeresen szabadalmaztatták. Másrésztől, Berg kísérlete miatt, amelyben egy potenciális humán patogén vírus (SV40) DNS-ébe vitte át egy bélflórában is előforduló mikroorganizmus (kóli) génjeit, a tudományos világ azonnal kritikával élt, és önmaga megkezdte a rekombináns DNS használatának szigorú szabályozását.

1975-ben Berg, a fejezetben említett genetikusok mellett számos jogászt és politikust is meghívott a kaliforniai Monterey félszigetén található Asilomar konferenciaközpontba, hogy a rekombináns DNS-technológiák alkalmazásának etikai, biztonsági, környezeti stb. feltételeit megvitassák (Berg et al. 1975). Az a tény, hogy maguk a vezető kutatók gyűltek össze a lehetséges rizikófaktorok kiszűrésére, mégpedig a technológia bevezetése előtt, a közvéleményben a genetikai mérnökséget az atombombához hasonló veszélyességi szintre emelte, amelynek alkalmazását az azt kifejlesztő atomfizikusok is hevesen vitatták valamivel korábban. Ezért a mérnökség helyett inkább a rosszízű genetikai manipuláció fogalom terjedt el az újsághírekben.

Az Asilomar konferenciát követően a törvényes szabályok kidolgozásáig két évre betiltották a rekombináns DNS kísérleteket. Ezt követően az alap kutatások hatalmas erővel folytatódtak. Fiers laborja már 1972-ben elkészíti az MS2 fág feji fehérjét kódoló szakaszának szekvenciáját (Min Jou et al. 1972), majd 1976-ban befejezi az MS2 RNS teljes szekvenciáját (Fiers et al. 1976). Ugyanebben az évben Walter Gilbert és Allan Maxam közlik a DNS bázisspecifikus kémiai hasításán alapuló új DNS-szekvenálási módszerüket (Maxam és Gilbert 1977). 1975-ben Edwin Southern kidolgozza a DNS-fragmentek lúgos denaturálást követő átvitelét és kötését (immobilizálását) nitrocellulóz filterekre (Southern 1975). Szintetikus oligonukleotid primerekkel és DNS-polimerázzal indított DNS-szintézis reakcióval lehetővé válik bármely DNS-szekvencia P^{32} izotóp jelölése. A radioaktív DNS próbák hibridizációjával a hasonló komplementer szekvenciákat hordozó homológ gének így egyszerűen kimutathatók az agaróz vagy poliakrilamid szekvenáló gélekről készült Southern-filtereken. Hasonló módon a DNS-kötő fehérjék, transzkripció faktorok „lábnyoma” is meghatározható keresztköti vegyületekkel és DNÁzzal kezelt DNS-szekvenciákban.

1977-ben Sanger közli második Nobel-díjához vezető új DNS-szekvenálási módszerét. Ebben adenin, guanin, citozin és timidin bázisanalógokat használ az oligonukleotidokkal indított és DNS-polimerázzal végzett DNS-szintézis véletlenszerű (ún. lán-

terminációt okozó) leállítására. Mivel a láncterminálás bármely nukleotidpozícióban bekövetkezhet, az eredmény egy sor olyan DNS-fragment, amelyek egymástól csak egy nukleotidhosszal különböznek. Ezt követően, a fragmentek poliakrilamid gélen történő elválasztásával a DNS szekvenciája könnyen leolvashatóvá vált (Sanger et al. 1977b; 11. ábra). Ugyanebben az évben Sanger leközli a ΦX174 fág DNS teljes szekvenciáját (Sanger et al. 1977a), majd ezt követi az SV40 vírus DNS-szekvenciája a Fiers-laborból 1978-ban (Fiers et al. 1978). Az élesztő alanin tRNS gén teljes szintézisét leíró 1972-es közleménye (Khorana et al. 1972) után Khorana DNS-polimeráz és ligáz alkalmazásával 1979-ben összeállítja átfedő oligonukleotidokból a szuppresszor tirozin tRNS teljes hosszúságú génjét (Khorana 1979). Ebben a génben a tRNS tirozin antikodonja (GUA) mutációval egy olyan antikodonná alakult (CUA), amely képes a stopkodonnal (TAG) párosodni és így a fehérjeszintézis leállítását egy tirozin beépítésével meggátolni. Nem utolsósorban 1979-ben megjelent az első közlemény, amely leírta a cukorbetegség kompenzálásához nélkülözhetetlen inzulin termeltetését kémiai szintetizált inzulin cDNS-ekről kóli baktériumban (Goeddel et al. 1979). Ezek után 1980-ra elkészült a rekombináns DNS-technikával izolált humán inzulin gén szekvenciája (Bell et al. 1980).



11. ábra. Egy DNS-szekvenáló gél (Sanger-módszer) részletének sematikus ábrázolása, a leolvasás irányának (nyíl) és a leolvasott szekvenciának a feltüntetésével

A fejezet végén az olvasó joggal teszi föl a kérdést, hogy mi történt a növényi kutatások területén a nagy biológiai fölfedezésekhez vezető 1950–1980-as években. Hogyan folytatódott az az impresszív fejlődés, amely a kutatásokat eljuttatta a mendeli szabályok megismerésétől a modern citogenetikai eszközöket alkalmazó növénynevelés kimagasló eredményeihez? Miért nem találkoztunk ebben a fejezetben olyan fölfedezésekkel, amelyek a növényi gének vizsgálataiból születtek? Amint azt a következő fejezetben látni fogjuk, ezekre a kérdésekre az egyszerű válasz az, hogy a géneket hordozó DNS bejuttatására növényi sejtekbe, a természetes megtermékenyítésen kívül, 1983-ig nem állt rendelkezésre semmilyen alkalmas technika, sem transzformáció, sem konjugáció, sem vírus transzdukció. A növény-transzformációhoz szükséges eszközt, éppen negyven évvel ezelőtt, egy növényi kórokozó baktérium, az *Agrobacterium tumefaciens* tumorindukcióért felelős Ti-plazmidjának fölfedezése szolgáltatta.

Felhasznált irodalom

- Akiba, T.–Koyama, K.–Isshiki, Y.–Kimura, S.–Fukushima, T. (1960). On the mechanism of the development of multiple drug resistant clones of Shigella. *J Microbiol* 4: 219–227.
- Arber, W.–Linn, S. (1969) DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 38: 467–500.
- Avery, O. T.–MacLeod, C. M.–McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of Pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus Type III. *J Exp Med* 79: 137–158.
- Baltimore, D. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209–1211.
- Beadle, G. W.–Tatum, E. L. (1941) Genetic control of biochemical reactions in Neurospora. *Proc Natl Acad Sci USA* 27: 499–506.
- Bell, G. I.–Pictet, R. L.–Rutter, W. J.–Cordell, B.–Tischer, E.–Goodman, H. M. (1980) Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284: 26–32.
- Benzer, S. (1961) On the Topography of the Genetic Fine Structure. *Proc Natl Acad Sci* 47: 403–415.
- Berg, P.–Baltimore, D.–Brenner, S.–Roblin, R. O. – Singer, M. F. (1975) Summary statement of the Asilomar conference on recombinant DNA molecules. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 1981–1984.
- Brenner, S.–Jacob, F.–Meselson M. (1961) An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190: 576–581.
- Britten, R. J.–Kohne, D. E. (1968) Repeated sequences in DNA. Hundreds of thousands of copies of DNA sequences have been incorporated into the genomes of higher organisms. *Science* 161: 529–540.
- Brownlee, G. G.–Sanger, F.–Barrell, B. G. (1967) Nucleotide sequence of 5S-ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nature* 215: 735–736.
- Büchner, E. (1897) Alkoholische Gärung ohne Hefezellen (Vorläufige Mitteilung). In: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 30: 117–124.
- Cairns, J. (1963) The chromosome of *Escherichia coli*. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 33: 43–45.
- Caspersson, T.–Schultz, J. (1939) Pentose nucleotides in the cytoplasm of growing tissues. *Nature* 143: 602–603.
- Chamberlin, M.–Berg, P. (1962) Deoxyribonucleic acid-directed synthesis of ribonucleic acid by an enzyme from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 81–94.
- Cohen, S. N.–Chang, A. C.–Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2110–2114.
- Cohen, S. N.–Chang, A. C. (1973) Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 1293–1297.
- Cohen, S.–Chang, A.–Boyer, H.–Helling, R. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3240–3244.

- Creager, A. N.–Morgan, G. J. (2008) After the double helix: Rosalind Franklin's research on Tobacco mosaic virus. *Isis* 99: 239–272.
- Crick, F. H.–Barnett, L.–Brenner, S.–Watts-Tobin, R. J. (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192: 1227–1232.
- Crick, F. H. (1966) Codon–anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* 19: 548–555.
- Dahm, R. (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics* 122: 565–581.
- Danna, K.–Nathans, D. (1971) Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenza. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 2913–2917.
- Dulbecco, R.–Vogt, M. (1963) Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1963 50: 236–243.
- Fiers, W.–Sinsheimer, R. L. (1962) The structure of the DNA of bacteriophage PhiX 174. III. Ultracentrifuge evidence for a ring structure. *J Mol Biol* 5: 424–434.
- Fiers, W.–Contreras, R.–Duerinck, F.–Haegeman, G.–Iserentant, D.–Merregaert, J.–Min Jou, W.–Molemans, F.–Raeymaekers, A.–Van den Berghe, A.–Volckaert, G.–Ysebaert, M. (1976) Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature* 260: 500–507.
- Fiers, W.–Contreras, R.–Haegemann, G.–Rogiers, R.–Van de Voorde, A.–Van Heuverswyn, H.–Van Herreweghe, J.–Volckaert, G.–Ysebaert, M. (1978) Complete nucleotide-sequence of SV40 DNA. *Nature* 273: 113–120.
- Franklin, R.–Gosling, R. G. (1953). Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature* 171: 740–741.
- Furth, J. J.–Hurwitz, J.–Krug, R.–Alexander, M. (1961) The incorporation of adenylic and cytidylic acids into ribonucleic acid. *J Biol Chem* 236: 3317–3322.
- Goeddel, D. V.–Kleid, D. G.–Bolivar, F.–Heyneker, H. L.–Yansura, D. G.–Crea, R.–Hirose, T.–Kraszewski, A.–Itakura, K.–Riggs, A. D. (1979) Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 106–110.
- Goulian, M.–Kornberg, A.–Sinsheimer, R. L. (1967) Enzymatic synthesis of DNA, XXIV. Synthesis of infectious phage phi-X174 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 2321–2328.
- Griffith, F. (1928) The significance of Pneumococcal types. *J. Hygiene* 27: 113–159.
- Harris, H. (1982) Joachim Hammerling. 9 March 1901–5 August 1980. *Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society* 28: 110–126.
- Hershey, A.–Chase, M. (1952) Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 36: 39–56.
- Hershey, A. D.–Burgi, E. (1965) Complementary structure of interacting sites at the ends of lambda DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 53: 325–328.
- Hickson, F. T.–Roth, T. F.–Helinski, D. R. (1967) Circular DNA forms of a bacterial sex factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 1731–1738.
- Hoagland, M. B.–Keller, E. B.–Zamecnik, P. C. (1956) Enzymatic carboxyl activation of amino acids. *J Biol Chem* 218: 345–358.
- Hoagland, M. B.–Stephenson, M. L.–Scott, J. F.–Hecht, L. I.–Zamecnik, P. C. (1958). A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J Biol Chem* 231: 241–257.

- Holley, R. W.–Apgar, J.–Doctor, B. P. (1960) Separation of amino acid-specific „soluble“-fraction ribonucleic acids. *Ann NY Acad Sci* 88: 745–751.
- Holley, R. W.–Apgar, J.–Everett, G. A.–Madison, J. T.–Marquisee, M.–Merrill, S. H.–Penswick, J. R.–Zamir, A. (1965a) Structure of a ribonucleic acid. *Science* 147: 1462–1465.
- Holley, R. W.–Everett, G. A.–Madison, J. T.–Zamir, A. (1965b) Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *J Biol Chem* 240: 2122–2218.
- Jackson, D.–Symons, R.–Berg, P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2904–2909.
- Jacob, F.–Monod J. (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3: 318–356.
- Kasten, F. H. (2003) Robert Feulgen and his histochemical reaction for DNA. *Biotech Histochem* 78: 45–49.
- Khorana, H. G. (1960) Synthesis of nucleotides, nucleotide coenzymes and polynucleotides. *Fed Proc* 19: 931–941.
- Khorana, H. G. (1965) Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Fed Proc* 24: 1473–1487.
- Khorana, H. G.–Agarwal, K. L.–Büchi, H.–Caruthers, M. H.–Gupta, N. K.–Kleppe, K.–Kumar, A.–Otsuka, E.–RajBhandary, U. L.–Van de Sande, J. H.–Sgaramella, V.–Terao, T.–Weber, H.–Yamada, T. (1972) Studies on polynucleotides. 103. Total synthesis of the structural gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *J Mol Biol* 72: 209–217.
- Khorana, H. G. (1979) Total synthesis of a gene. *Science* 203: 614–625.
- Klein, G.–Klein, E. (2003) Torbjörn Caspersson, 15 October 1910 – 7 December 1997. *Proc Amer Philos Soc* 147: 73–75.
- Kleinschmidt, A.–Zahn, R. K. (1959) Über Desoxyribonukleinsäure-Molekullen in Protein-Mischfilmen. *Z Naturforsch* 14b: 770–779.
- Kornberg, A. (1960) Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science* 131: 1503–1508.
- Kunz, H. (2002) Emil Fischer –Unequaled Classicist, Master of Organic Chemistry Research, and Inspired Trailblazer of Biological Chemistry. *Ang Chem Int Ed* 41: 4439–4451.
- Leder, P.–Nirenberg, M. (1964) RNA codewords and protein synthesis. II. Nucleotide sequence of a valine RNA codeword. *Proc Natl Acad Sci USA* 52: 420–427.
- Lederberg, J.–Tatum, E. L. (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158: 558.
- Lederberg, J. (1952) Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol Rev* 32: 403–430.
- Lehman, I. R.–Bessman, M. J.–Simms, E. S.–Kornberg, A. (1958) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 233: 163–170.
- Lengyel, P.–Speyer, J. F.–Ochoa, S. (1961) Synthetic polynucleotides and the amino acid code. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 1936–1942.
- Lerman, L. S. (1963) The structure of the DNA-acridine complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 49: 94–102.
- Levene, P. A. (1919) The Structure of yeast nucleic acid: IV. Ammonia hydrolysis. *J Biol Chem* 40: 415–424.

- Lobban, P.–Kaiser, A. (1973) Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J Mol Biol* 78: 453–471.
- Lodish, H. F.–Zinder, N. D. (1966) Semi-conservative replication of bacteriophage f2 RNA. *J Mol Biol* 21: 207–209.
- Loening, U. E. (1967) The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamide-gel electrophoresis. *Biochem J* 102: 251–257.
- Luria, S. E.–Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28: 491–511.
- Marcker, K.–Sanger, F. (1964) N-formyl-methionyl-S-RNA. *J Mol Biol* 8: 835–840.
- Marmur, J.–Doty, P. (1962) Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 5: 109–118.
- Maxam, A. M.–Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 560–564.
- McDonell, M. W.–Simon, M. N.–Studier, F. W. (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol* 110: 119–146.
- Meselson, M.–Stahl, F. W. (1958). The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 44: 671–82.
- Meselson, M.–Yuan, R. (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217: 1110–1114.
- Min Jou, W.–Haegeman, G.–Ysebaert, M.–Fiers, W. (1972). Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature* 237: 82–88.
- Naughton, M. A.–Dintzis, H. M. (1962) Sequential biosynthesis of the peptide chains of hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 1822–1830.
- Nirenberg, M. W.–Matthaei, J. H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 1588–1602.
- Olby, R. (1994) The path to the double helix: The Discovery of DNA. Mineola, NY: Dover Publications, Inc.
- Pirie, N. W. (1990) Jean Brachet. 19 March 1909–10 August 1988. *Biogr Mem Fell R Soc* 36: 84–99.
- Radloff, R.–Bauer, W.–Vinograd, J. (1967) A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 57: 1514–1521.
- Roth, T. F.–Helinski, D. R. (1967) Evidence for circular DNA forms of a bacterial plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 58: 650–657.
- Sanger, F. (1959) Chemistry of Insulin: determination of the structure of insulin opens the way to greater understanding of life processes. *Science* 129: 1340–1344.
- Sanger, F.–Air, G. M.–Barrell, B. G.–Brown, N. L.–Coulson, A. R.–Fiddes, C. A.–Hutchison, C. A.–Slocombe, P. M.–Smith, M. (1977a) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265: 687–95.
- Sanger, F.–Nicklen, S.–Coulson, A. R. (1977b) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463–5467.

- Smith, H. O.–Wilcox, K. W. (1970) A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 51: 379–391.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503–508.
- Temin, H. M.–Mizutani, S. (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211–1213.
- Thannhauser, S. J. (1928) Die Nucleine und der Nucleinstoffwechsel. In: Bertram, F. (ed.) *Stoffwechsel und Energiewechsel*. Springer, Berlin, 1048–1094.
- Tsugita, A.–Fraenkel-Conrat, H. (1960) The amino acid composition and C-terminal sequence of a chemically evoked mutant of TMV (tobacco mosaic virus). *Proc Natl Acad Sci USA* 46: 636–642.
- Ullmann, A.–Monod, J. (1968) Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 2: 57–60.
- Volkin, E.–Astrachan, L.–Countryman, J. L. (1958) Metabolism of RNA phosphorus in *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Virology* 6: 545–555.
- Wang, J. C. (1971) Interaction between DNA and an *Escherichia coli* protein ω . *J Mol Biol* 55: 523–526.
- Watson, J. D.–Crick, F. H. (1953) A structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature* 171: 737–738.
- Watson, J. D. (2002) *Genes, Girls, and Gamow: After the Double Helix*. Random House, New York.
- Weil, R.–Vinograd, J. (1963) The cyclic helix and cyclic coil forms of polyoma viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 50: 730–738.
- Witkin, E. M. (2005) Remembering Rollin Hotchkiss (1911–2004). *Genetics* 170: 1443–1447.
- Wöhler, F. (1828). Über künstliche Bildung des Harnstoffs. *Annalen der Physik und Chemie* 88: 253–256.

3. A molekuláris növénybiológia mérföldkövei a transzformációtól a genominformatikai robbanásig

Összefoglalás

Ez a fejezet a molekuláris növénybiológia elmúlt negyven évének történetét ismerteti, néhány hazai tudományos eredményt is megemlítve. A szomatikus sejthibridizáció fejlődésének és a növénybiológia modelljének választott lúdfű genetikai rendszerének (*Arabidopsis*) áttekintése után megtudhatjuk, hogyan vált az agrobaktérium transzferált DNS-e általános génátviteli vektorként a molekuláris növénygenetika alapeszközévé. Az *Arabidopsis* teljes genom szekvenciájának elkészítéséhez vezető kutatási programot követően megismerhetünk számos olyan új technológiát, amelyekkel a növényi gének szekvenciája nagy pontossággal és célzottan módosítható. Végül, a három tudománytörténeti fejezet egymásra épülő tudásanyaga alapján megvizsgáljuk azt a kérdést, hogy kell-e félnünk a genetikailag módosított növényektől.

Summary

This chapter provides an overview on brief history of past forty years of plant molecular biology by mentioning some contributions from Hungarian researchers. After reviewing some achievements in the area of somatic cell hybridization and describing how the establishment of an excellent genetic system led to choosing *Arabidopsis* as an accepted model in plant biology, we learn how the transferred DNA (T-DNA) of *Agrobacterium* became a general gene transfer vector and basic tool of plant molecular biology. Next, we gain an insight into an internationally coordinated project that led to completion of full length sequence of the *Arabidopsis* genome, and become familiar with several new technologies that permit targeted modification of plant genes at the highest preciseness. Finally, based on the pyramided knowledge discussed in the three chapters, we shall examine the intriguing question whether one needs to fear and prohibit genetically modified plants.

„A dolgoktól az életben nem félni kell, hanem azokat megérteni.
Itt az idő, hogy többet értsünk és kevesebbet féljünk.”
(Marie Curie)

Az 1970-es évek elején elindul a rekombináns DNS-technológia, a genetikai mérnökség robbanásszerű fejlődése. A fág-, vírus-, baktérium-, élesztő- és *Drosophila*-genetika területén az új felfedezéseket és módszereket ismertető közlemények heti, sőt napi ritmusban jelennek meg. Napjainkban másodpercenként több tucat közleményt küldenek a molekuláris biológiával foglalkozó kutatók a folyóiratokhoz. Mivel a területen dolgozó laboratóriumok száma néhány százról százezer fölé emelkedett az elmúlt negyven év alatt, az összes lényeges felfedezés címszavas megemlítése is több ezer kötetes enciklopédia kiadását igényelné. Ezért, mint az előző fejezetekben is tettük, történeti áttekintésünkben továbbra is azt követjük, hogyan vált ismertté a tulajdonságokat meghatározó gének szerkezete, szabályozása és organizmusok közötti természetes átvitele. Emellett, a teljesség igénye nélkül, ebben a fejezetben betekintünk a tudományos fejlődés egyes fejezeteinek hazai történetébe is. Mielőtt továbblépünk, és megismerjük, hogyan tette lehetővé a genetikai mérnökség a növényi életfunkciók molekuláris szintű megismerését, foglaljuk össze röviden az eddig tárgyalt ismereteket.

A génátvitel és mutagenézis természetes folyamatok

A nagy felfedezések és felfedezők történetét követve megismertük azokat az alapfogalmakat, amelyek alapján az olvasó könnyen megértheti, hogyan is lehet földeríteni a gének funkcióit és szabályozását a DNS-, RNS- és fehérjemolekulák tanulmányozásával. Amint láttuk, a tudomány történetében a tulajdonságok átvitele és átalakítása, a transzformáció volt az az alapvető eszköz, amely lehetővé tette az azokért felelős molekulák azonosítását, valamint rendeltetésük, módosításaik és kölcsönhatásaik megértését. A kémia, biokémia, enzimológia és anyagcsere-folyamatok úttörő kutatói lényegében azzal foglalkoztak, hogy rájöjjenek, miként alakulnak vagy alakíthatók át (transzformálódnak vagy transzformálhatók) az egyes molekulák más formába; hogyan történik vagy végezhető el mesterségesen azok szintézise és lebontása, és hogyan szabályozhatók vagy szabályzódnak ezek a folyamatok kémcsőben és a természetben, az egyes organizmusok sejtjeiben.

Megállapítottuk, hogy az öröklődő (genetikai) információ átvitele, a szaporodás vagy önreprodukció, az élővilágban a tulajdonságokért felelős géneket hordozó DNS (vagy vírusok és fágok esetén esetlegesen RNS) átvitelével, szülők közötti kicserélődésével történik. Ennek következtében az utódokban a szülői gének új kombinációi jönnek létre a DNS-t hordozó kromoszómák rekombinációjával, és ezek egy újabb reprodukció során megint átjutnak az utódokba. A primitív egysejtű baktériumok példáján láttuk, hogy a genetikai információ átvitele megtörténhet akár egy elhalt baktérium DNS-ének fölvételével transzformáció útján, de gyakrabban két élő bak-

tériumsejt közötti direkt DNS-átvitellel, konjugációval. Láttuk, hogy a természetes génátviteli folyamatokat használják ki azok a kórokozók is, amelyek szaporodásukhoz a gazdaszervezet DNS- és RNS-replikációs, -transzkripció és -transzlációs apparátusait használják fel. Ezek a kis DNS- vagy RNS-molekulát hordozó bakteriofágok és soksejtű eukarióta organizmusokat fertőző vírusok rendkívül változatos módon szaporodnak és lépnek kölcsönhatásba a gazda genetikai anyagával. A kísérletek részleteibe betekintve megértettük, hogy a baktériumok közötti DNS-átvitelt olyan önálló replikációra képes cirkuláris DNS-molekulák (szexfaktorok, episzómák vagy plazmidok) közvetítik, amelyek képesek a baktérium kromoszómájába is beépülni és annak replikációja során azt mobilizálni a baktériumok közötti szexcsatornákon át egy új gazdába. Az antibiotikum-rezisztenciát hordozó szexfaktorok vizsgálata a különböző baktériumfajokban kiderítette, hogy azok DNS-e a kólibaktériumban is replikálódik, és onnan számos más baktériumtörzsbe átkonjugálható. Ezzel ismertté vált, hogy a baktériumok birodalmában az információátvitelnek gyakorlatilag nincsenek faji határai. Ez természetesen felvetette azt az érdekes kérdést, hogy lehetséges-e az információ ún. horizontális átvitele a baktériumokból az általuk fertőzött magasabb rendű organizmusok sejtjeibe. Ennek földerítéséhez azonban szükséges volt a konjugáció mechanizmusának későbbi részletes megismerése.

Azt is láttuk, hogy bizonyos fágok is képesek a gazda kromoszómájába beépülni, majd onnan kivágódni úgy, hogy közben DNS-ükkel magukkal ragadnak a gazda kromoszómájából géneket, majd a fágkapszulába csomagolódva azokat átvihetik más baktériumokba. Továbbá megismertük, hogy vannak olyan RNS vírusok, amelyek reverz-transzkriptázt kódolnak, és így RNS-ükről DNS-t szintetizálnak, amely beépülhet a gazda kromoszómába. Természetesen, ha az ilyen vírusok RNS-einek DNS-kópiái génekbe épülnek be, akkor azok funkcióit elrontják, azaz mutációkat okozhatnak. Emellett számos vírus kódol olyan géneket, amelyek a gazdasejtek osztódását szabályozzák, pl. indukálják a differenciált testi sejtek korlátlan osztódását, és ezáltal tumorképződést, rákot okoznak.

A mutációs elmélettel kapcsolatosan megtudtuk, hogy minden organizmus összes sejtje – azok is amelyek a reprodukcióért felelősek – az organizmus teljes életideje alatt ki van téve a DNS-ben változásokat okozó természetes tényezőknek. Ilyenek pl. a nap UV-sugárzása, reaktív oxigén származékok (pl. ózon), a DNS-t módosító vagy a DNS-polimeráz aktivitását és javító funkcióját, valamint a rekombinációt és kromoszómaszegregációt befolyásoló vegyületek stb. Ugyanakkor láttuk, hogy egy gén öröklődésének vizsgálatához szükséges az, hogy a gén funkcióját módosítsuk, azaz megváltoztassuk a gén által kódolt tulajdonságot (a fenotípust) egy mutáns génforma (allél) fölhasználásával. Mivel a természetben állandóan keletkeznek mutációk, az élőlények társulásaiban könnyen találhatunk megváltozott fenotípusú egyedeket. Az élővilágban a tulajdonságok rendkívül gazdag természetes variációját tapasztalhatjuk minden családban és nemzetségben. Ezek a természetes mutációk azok, amelyeket a nemesítésben is fölhasználunk. Azaz tulajdonképpen az evolúció során elrontott vagy megváltozott és különböző módon kombinált géneket használjuk föl arra, hogy pl. táplálékforrásainkat szolgáltató növényeink tulajdonságait javítsuk.

A genetikai gondolkodás fejlődését nyomon követve láthattuk, hogy a kutatók (pl. Luria-Delbrück fluktuációs tesztjében) a természetes mutációkat okozó faktorokat, mint pl. röntgen- vagy UV-sugárzást használtak föl arra, hogy a természetben is előforduló, vagy ott életképtelenséget okozó mutációkat indukáljanak vagy reprodukáljanak. A természetes mutációkhoz hasonlóan, amit ma „természetes variáció vagy génpool” néven emlegetünk, és az emberiség közkincsének tartunk, a laboratóriumban indukált (és ezért sokszor elitelt és félelemmel emlegetett) mutációk engedik meg az új tulajdonságok létrehozását.

Az eddig áttekintett folyamatok alapján logikus, hogy a legtöbb mutációról azt feltételezhetjük, hogy elrontja egy gén funkcióját, azaz funkcióvesztéshez vezet. Azonban, pl. Jacob és Monod *lacI* represszorának megismerése alapján azt is fölfedeztük, hogy egy gén funkcióvesztést okozó mutációja egy másik gén aktiválódásához, azaz funkciónyeréshez vezethet. Másrészt, a „lötyögő” kodonnal kapcsolatosan megtudtuk, hogy nem minden mutáció változtatja meg a fehérjék aminosav-sorrendjét és a fehérjék által meghatározott tulajdonságot. Továbbá az is nyilvánvalóvá vált, hogy azok a mutációk, amelyek nem befolyásolják egy enzim aktivitását, bár aminosav-cserélődést okoznak, általában nem változtatják meg az enzimhez kapcsolt tulajdonságot. Mégis, az ilyen aminosavcserét okozó mutációk módosíthatják a fehérjék térszerkezetét. Ennek az lehet a következménye, hogy a fehérje elveszti az aktivitását, például ha normális körülmények helyett a vizsgált organizmust alacsonyabb vagy magasabb hőmérsékletre helyezzük. Azaz a körülményektől függően a mutációk hatása feltételes, kondicionális is lehet. Az ilyen mutációkat hordozó növények pl. lassabban növekedhetnek, vagy egyáltalán nem fejlődnek hidegebb vagy melegebb égtájakon. A bázis-, illetve aminosavcserét okozó pontmutációkkal szemben láttuk, hogy a génekbe integrálódó fág vagy vírus DNS-ek, vagy pl. a McClintock által fölfedezett ugráló gének vagy kontrolláló elemek (1. ábra), általában elrontják a gének funkcióit, és ezzel teljes funkcióvesztéssel járó mutációkat okoznak. Előfordulhat azonban, hogy az ilyen inszerciós mutációk a gének kódoló régiói végén keletkeznek, és ezért nem gátolják a gén transzkripcióját RNS-sé, de megváltoztatják az arról szintetizált fehérje C-terminális régióját. Ennek gyakori következménye az, hogy a fehérje csak részlegesen veszíti el az aktivitását, és így pl. egy színyanyag (lila antocianin vagy zöld klorofill) termelése lecsökkenhet, de nem szűnik meg teljesen, ami pl. halványlila vagy sárgászöld színű virágszirom vagy levél megjelenéséhez vezet.

Az első fejezetben nyomon követtük a különböző növényfajok közötti keresztezés lehetőségeit és korlátait. Megtudtuk, hogy távoli fajok között is lehetséges utódot létrehozni a természetes gátló mechanizmusok megkerülésével, és azt is, hogy ezek a kerülő utak léteznek a természetben is. Egy ilyen természetes kerülő út az, hogy a növényfajok társulásaiban a normális diploid ($2n$) egyedek mellett megtalálhatók azok kromoszóma-duplikációt hordozó, tetraploid változatai is, amelyek más fajok diploid vagy tetraploid egyedeivel sikeresen képesek utódot létrehozni. A meiótikus kromoszómapárosodás és -rekombináció okozta inkompatibilitás mellett láttuk azt, hogy egy életképes utód létrejötte függ attól, hogy a hibrid növény képes-e önmegporzásra vagy ön-inkompatibilis, azaz hímivarsejtje nem életképes a női ivarszervén. Ezen



1. ábra. Az egyes kukoricaszemek antociános (sötét) színeződésének eltérő mintázatát a transzpozonok („ugráló gének”) alakítják ki, amint azt Barbara McClintock az 1940-es években felfedezte

fölül megismertük azt is, hogy a sejtorganellumok, a kloroplasztisz és mitokondrium működéséhez szükséges szülői sejtmagi gének különbségei befolyásolhatják az utód életképességét vagy termékenységét, pl. hímsterilitást okozva. Továbbá hallottunk olyan példáról is, ami azt mutatta, hogy a szülői genomok aránya az embriózsák triploid ($3n$) központi sejtjében (amelyből az embriót tápláló magszövet, endospermium létrejön) határozza meg annak életképességét, és azáltal az embrióét is.

A nemesítói gyakorlatban mindennapos az, hogy a ma fogyasztott növények előállításánál ezeket a sikeres megtermékenyítést gátló folyamatokat megkerülik annak érdekében, hogy más fajokból vagy fajtákból előnyös tulajdonságokat juttassanak a táplálék- és haszonnövényeinkbe. A kromoszómapárosodás okozta problémák (pl. kromoszómavesztés, -törés stb.) kiiktatása céljából például gyakorlat az, hogy a távoli vad fajok kromoszómáit besugárzással összetörik, hogy csak a kívánt tulajdonságokat hordozó kromoszómaszakaszok kerüljenek át a hibridekbe. A legtöbb esetben a nemesítők csak a kívánt, előnyös tulajdonságot kódoló génekre tudnak szelektálni a hibridek előállításánál, de nincs ismeretük más génekről, amelyek azokkal együtt (kapcsolatlan) jutnak egyik fajból a másikba.

Az első fejezetben azt is olvashattuk, hogy a Stadler által bevezetett sugármutagenézis a növénynemesítés egyik alapeszközévé vált, és ezt követte számos kémiai mutagén sikeres használata. Amikor egy nemesítő mutagén kezelést hajt végre, tud-

nia kell, hány mutációt indukál átlagosan minden egyes mutagenizált növény genomjában, hogy abban kb. hány gén van, és milyen gyakorisággal izolálhat egy mutációt a kívánt tulajdonságért felelős génben. Emellett természetesen ismernie kell a mutagén fizikai hatásmechanizmusát. Nevezetesen azt, hogy a fölhasznált sugárzás vagy vegyület milyen bázist módosít, és hogy nukleotidcserét vagy -inszerciót vagy netalán kromoszómatörést okoz. Ahhoz, hogy gyorsan megtalálja a kívánt tulajdonságot megváltoztató mutációt (amelyet Mendel törvényeinek megfelelően csak a mutagenizált növények utódjaiban lát először, ha a mutáció nem domináns), természetesen egy kompromisszumot kell találnia az alkalmazott mutagén dózisa, az indukált mutációk átlagos (egy genomra eső) száma és a megvizsgált utódnövények mennyisége között. A mutációs kísérletek helyes tervezése ezért a nemesítés sarokköve.

Könnyen belátható, hogy a mutációt okozó kezelés hatásfokával arányosan emelkedik a mutációk átlagos száma és annak a valószínűsége is, hogy egy mutáció „eltalál” egy kívánt tulajdonságért felelős gént. A mutációk átlagos számának emelésével azonban nő annak a valószínűsége is, hogy a nagy munkával kisselektált új tulajdonságot mutató növény a kívánt génmutáció mellett (amelynek természetét, szekvenciáját, szabályozását vagy fehérjetermékét a nemesítő csak ritkán ismeri), számos más mutációt is tartalmaz. Ezért a nemesítő a mutánst „vakon” visszakeresztezi a vad szülővel, majd ismét kisselektálja a hibrid utódgenerációjában. Mivel minden egyes keresztezés során a függetlenül szegregáló nem kívánt mutációknak csak a felét tudja eltávolítani, ezt a folyamatot többször megismétli. Öt visszakeresztezés után, ami a növényfaj generációs idejétől függően akár 5–10 évet is igénybe vehet, $0,5^5=0,03125$, azaz 3,1% a valószínűsége annak, hogy a kívánt mutáns nem tartalmaz egy másik független mutációt. Természetesen ha a mutációk átlagos száma magas, akkor valószínű az, hogy a kisselektált tulajdonságért felelős génhez közel, ugyanazon a növényi kromoszómán is előfordul egy másik mutáció. Mivel az ilyen kapcsolt mutációt csak rekombináció cserélheti ki a vad szülőttől kapott normális allélra, eltávolítása annál nehezebb, minél közelebb van a használni kívánt mutáns génhez, és ezért ehhez sok visszakeresztezéssel kapott F2 utód átvizsgálása szükséges. A gyakorlatban a nemesítő legtöbbször nem észleli a nem kívánt mutációkat. Ugyanis nem tudja, hogy azok milyen fenotípust okoznak, azaz milyen tulajdonságot befolyásolnak. Természetesen ugyanez a helyzet akkor is, ha a nemesítő „környezetbarát módon” nem használ mutagént, hanem egy új tulajdonságért felelős gén allélját keresztezéssel juttatja át a hibridbe egy természetben talált közeli variánsból. A nemesítő ebben az esetben sem tudja azt, hogy a természetett fajtához hasonlítva a kívánt tulajdonságot szolgáltató keresztezési partner hány más gén természetes mutációját hordozza.

Végül, a helyzet még sokkal komplikáltabb, ha a kívánt tulajdonság – mint pl. a magméret, levélforma, vagy gyökérnövekedés stb. – megváltoztatásához több gén együttes funkciójának megváltoztatása, azaz több mint egy mutáció szükséges. Míg az ilyen kvantitatív tulajdonságokat kódoló gének kromoszomális helyzete genetikailag térképezhető, addig átvitelük egy már elkészült nemesített vonalba rendkívül bonyolult, ha egyáltalán megoldható. Ezért a nemesítők a kvantitatív jegyek gyorsabb javítása érdekében inkább fölhasználják a keresztezésekből nyert elsődleges utódokban észlelhető

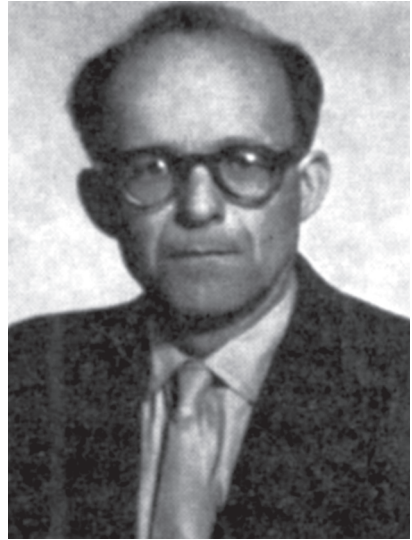
„hibrid vigor” nyújtotta előnyöket, a szülőkhöz hasonlítva nagyobb termés- és növekedési átlag megjelenését. Ilyen hibrid vigorral rendelkező vetőmag előállítására azonban csak állandó új keresztezési munkával lehetséges, mert az utódokban a „hibrid vigor” gyorsan eltűnik. Ezért a nemesítők megpróbálják a hibrideket úgy stabilizálni, hogy azok kromoszómaszámát megkettőzik, azaz elősegítik a kombinált szülői kromoszómakészletek független párosodását és szegregációját a meiózisban. Alternatív módon, megpróbálnak olyan kezeléseket fölhasználni, amelyek indukálják a hibridek apomixisét, azaz kromoszómakészletük kizárólagos anyai úton történő öröklődését. A hibridek esetén is könnyen belátható azonban, hogy a nemesítő nem rendelkezik információval a kiinduló szülői genomok összes génjéről és azok különböző alléljeiről. Ezért teljesen meg kell bízni abban, hogy a tradicionálisan termesztett növények genomjai nem tartalmaznak olyan géneket, amelyek pl. toxikus termékek szintéziséért lennének felelősök. Ez a tudás azonban nem mindig hozzáférhető olyan esetekben, amikor távoli vad fajokat hibridizálnak termesztett fajokkal. Végül meg kell jegyeznünk, hogy a szülői gének kölcsönhatása következtében megjelenő hibrid vigor vagy heterózis jegyekért felelős mechanizmusok molekuláris magyarázata még távol áll a teljes megértés szintjétől. Azaz egy olyan jelenséget használunk föl a gyakorlati nemesítésben, amelyet nem tudunk még részleteiben megmagyarázni vagy irányítani. Mégis több mint 150 éve használjuk ezt a nemesítési eszközt arra, hogy a növekvő számú emberiséget élelmiszerekkel és ipari alapanyagokkal sikeresen ellássuk. És senki sem tiltakozik az ellen, hogy kellő ismeretek hiányában ezt a hasznos gyakorlatot folytassuk. De térjünk vissza most a tudománytörténet elhagyott fonalához, és ismerjük meg, hogyan lépett át a klasszikus növénygenetika és -nemesítés a molekuláris kutatások korszakába.

Szövettenyésztés és sejtfúzió

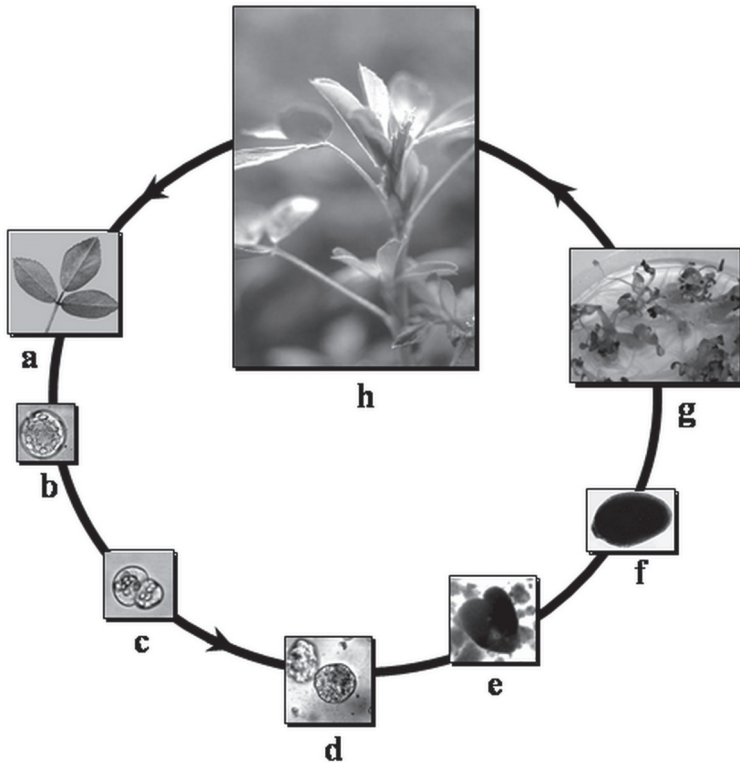
Watson és Crick DNS kettős spirál modelljétől a molekuláris kutatások 1953 és 1973 között eljutottak a génizolálás és DNS-, RNS-, fehérjeszekvenálás matematikai pontosságú módszereinek alkalmazásáig. Ezalatt a növénybiológia és -nemesítés még csipkerózsika-álmát alussza, és a mutagenézissel kombinált citogenetika és szövettenyésztés eszközeivel próbálja feltörni a fajok közötti természetes génátvitel inkompatibilitási gátjait. Amint azt az első fejezetben láttuk, az 1950-es években már hozzáférhetőek olyan szövettenyésztési technikák, amelyek lehetővé teszik életképes embriók visszanyerését távoli fajok keresztezéssel nyert hibridjeiből. Hasonlóan, a virágok porzójából nyert szövettenyészetekből haploid, azok kolhicin-kezelésével pedig duplikált kromoszómaszámú növényeket lehetett előállítani. Amint említettük, ezek első példáit len fajokra az *Arabidopsis*-szal is foglalkozó Laibach írta le 1925-ben. Érdekes azonban tudnunk, hogy a növényi szövettenyésztés alapvető módszereit a magyaróvári születésű Gottlieb Haberlandt (1854–1945) osztrák botanikus dolgozta ki az 1900-es évek elején (Laimer és Rucker 2003). Édesapja, Friedrich Haberlandt ugyancsak az óvári főiskolán tanított. Neki köszönhetjük a szójabab nemesítését és bevezetését a hazai élelmiszernövények körébe.

Magyaróváron alapítja meg 1945–48-ban az első növénygenetikai laboratóriumot a szegedi egyetemről indult Győrffy Barna (1911–1970) (2. ábra) is, aki, mint említettük, 1937–39-ben a berlini Vilmos Császár Intézetben Tyimofejev-Reszovszkij és Zimmer mellett dolgozott. Berlinben Győrffy, Friedrich Wettstein (1895–1945) mohagenetikussal a poliploidizáció evolúciójában játszott szerepét tanulmányozta. 1938-ban Győrffy Wettstein munkatársával, Georg Melchersszel (1906–1997) – akivel élete végéig barátságban maradt – elsőként közölte a kolchicinnel előállított poliploid (amfitetraploid) hibridek citológiai vizsgálatát. Győrffy kiválóan ismerte Morgan, Muller, Sturtevant és más korabeli genetikusok eredményeit, és fölhasználta azokat a kutatásban és oktatásban. Ezért 1951-ben anti-liszenkóista elvei miatt fölmentették, majd Sztálin halála után (amely egy hónappal megelőzte Watson és Crick DNS kettős spirál modelljének közlését) 1954-ben mégis megbízták az akadémia Genetikai Intézetének vezetésével (Igali 2002). A genetikai intézet egyik doktori hallgatója 1954-ben Rédei P. György (1921–2008), aki akkor a búza (*Triticum turgidum*) és rozs keresztezésén dolgozott Kiss Árpád kollégájával együtt a martonvásári nemesítő intézetben. Rédei az embriómentés szövetyenyésztési technikáját használta búza hibridek előállítására, de készített osztódó kukorica, búza, rozs endospermium és répagyökér sejt kultúrákat is, amelyekkel Győrffy a szomatikus sejtek röntgenmutagenézisét szerette volna vizsgálni. Meg kell említenünk, hogy a poliploidizációt, szövetyenyésztést, embriómentést stb. fölhasználó növénygenetikai kutatások mellett, Lederberggel konzultálva Győrffy az 50-es években elindította számos baktérium genetikai vizsgálatát is (Rédei 1986). Intézetében többek között a növénypatogén *Pseudomonas* és *Xanthomonas*, új bakteriocin termelésért felelős *Serratia*, és nitrogénfixálásért felelős *Rhizobium* törzsek és azok fágjainak mutációit tanulmányozták. Győrffy egyik munkatársa Balassa (Meller) Rózsi (1902–1960), a hallei mezőgazdasági egyetemen végzett, és korábban Bécsben dolgozó vegyész volt. Kutatómunkája mellett Meller Rózsi és Frank Maar álnéven írt számos német, majd magyar nyelvű könyvet és nagyszerű színdarabot is. Balassa 1953-tól cisztein auxotróf *Rhizobium* mutánsokat komplementált DNS-transzformációval és eredményeiről 1960-ban számolt be a Nature folyóiratban (Balassa 1963). Kollégája, Gábor Magda DNS-transzformációval *Pneumococcus* géneket térképezett az előző fejezetben említett későbbi férjével, Rollin Hotchkiss-szal együttműködésben (Gabor és Hotchkiss 1966).

A hajtás- és gyökérmerisztémák osztódó szöveteiből, ún. kalluszokból Roger Gautheret (1910–1997) francia botanikus regenerált először növényeket a Sorbonne



2. ábra. Győrffy Barna (1911–1970), az első magyar növénygenetikai laboratórium megalapítója

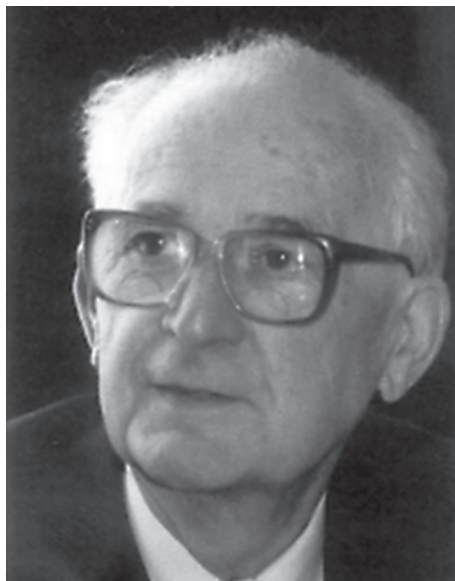


3. ábra. Megfelelő körülmények között embrió, majd teljes lucernanövény felnevelhető egyetlen izolált levélsejtből, igazolva, hogy a növényi testi sejtek visszanyerhetik a totipotencia képességét: a) levél, b) izolált levélsejt (protoplaszt), c) osztódó tenyésztett levélsejt, d–f) globuláris, szív, illetve torpedó stádiumú szomatikus eredetű embrió, g) az embriókból in vitro felnevelt növénykék, h) fejlett lucernanövény (Fehér Attila ábrája)

Egyetemen. Gautheret az 1959-es szövettenyésztési ismereteket összefoglaló könyvében (Gautheret 1959) többször hivatkozik Rédei munkáira, amelyekben az auxint használt osztódó sejt kultúrák előállítására. Haberlandt-tal egyezően, Gautheret meggyőződése az volt, hogy a növényi sejtek totipotensek, és ezért elvileg minden egyes sejtből egy új növény regenerálható. Az auxin, citokinin és gibberellin hormonok fölfedezése és a szövettenyésztéshez használt táptalajok kidolgozása után (lásd első fejezet) 1965-re több egy- és kétszikű növényfaj szövet- és embriótenyésztése vált lehetővé az osztódó sejtek folyadékkultúráiban is (Thorpe 2007). Így a szövettenyésztésekben nemcsak a sejtosztódás szabályozását, de az egy sejtől származó embriók, illetve hajtások vagy gyökerek differenciálódását is tanulmányozni lehetett (3. ábra). 1960-ban Edward C. Cocking nottinghami botanikus fölfedezte, hogy *Myrothecium verrucaria* kórokozó gomba celluláz enzimével paradicsom gyökércsúcs szövetekből sejtfa nélküli sejtek, protoplasztok izolálhatók, és megfelelő ozmotikus nyomást biz-

tosító só-, illetve cukortartalmú táptalajokban a sejtfal regenerálása után osztódásra készíthetők (Cocking 1961). 1968-ra japán kutatók kidolgozzák a sejtfalemészítő gomba celluláz és pektináz (macerozim) enzimek tisztítását. 1971-ben Georg Melchers tübingeni laboratóriuma számol be az első protoplasztból regenerált dohánynövényről (Takabe et al. 1971). 1972-ben két dohányfaj, *Nicotiana glauca* ($2n=24$) és *N. lagsdorffi* ($2n=18$) levélsejtjeinek nátrium-nitráttal indukált fúziója után Carlson és munkatársai New Yorkban elkészítenek egy amfidiploid, ($2n=48$) kromoszómaszámú hibridet (Carlson et al. 1972). Ez fölveti annak lehetőségét, hogy a fajok közötti szexuális inkompatibilitást, a nemesítésben addig alkalmazott bonyolult eljárások helyett, a sejtfúzió módszerével egyszerűen meg lehet kerülni. Ezt a lehetőséget látszott támogatni az emlős sejtbológia területén Boris Ephrussinak és munkatársának, Mary Weissnek 1965-ben közölt észlelése, hogy egér és patkány sejtek fúziójával új tulajdonságokat mutató, osztódó hibrid sejtek készíthetők (Ephrussi és Weiss 1965). A növények esetében előnyként főnnállt annak a lehetősége, hogy a hibrid sejtekből termőképes növényeket lehet regenerálni. Továbbá a protoplasztok életképességét kevésbé befolyásoló, pl. polietilén-glikolt vagy elektrosokkot alkalmazó sejtfúziós módszerek megjelenése 1974–76-tól nagyban megkönnyítette a sejthibridek előállítását.

A sejthibridizáció egyik fő kutatási területe lett a pesti genetikai intézet helyébe lépő Szegedi Biológiai Központnak (MTA) is, amely Straub F. Brunó (1914–1996) (4. ábra) nemzetközi kapcsolatainak és szervezőmunkájának köszönhetően az Egyesült Nemzetek Oktatási, Tudományos és Kulturális Szervezetének (UNESCO) támogatásával 1971-ben kezdte meg munkáját. (Straub, akinek 100. születésnapját ünnepeltük ebben az évben, Szentgyörgyi Albert munkatársa volt Szegeden. Ő izolálta először az aktin izomfehérjét, és jellemezte biokémiai kölcsönhatásait az izomkontrakciót irányító miozinnal. Emellett jelentős szerepet játszott a sejtlégzésben alapvető funkciót ellátó sárga enzim [NADPH dehidrogenáz flavoprotein] izolálásában és az enzimek térszerkezetét szabályzó fehérjék azonosításában és jellemzésében.) Az SZBK-ban két fiatal kutató, Dudits Dénes és Maliga Pál kezdett el intenzíven foglalkozni a szomatikus sejthibridizációval. 1974-ben Maliga Melchers tübingeni laboratóriumában haploid és diploid dohányfajták sejtfúzióját tanulmányozta, míg Dudits az egyszikű haszonnövények és lucerna szövettenyészetén, illetve haploid változatai-



4. ábra. Straub F. Brunó biokémikus akadémikus, az MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpontjának megalapítója



5. ábra. Levélsejtekből származó összeolvadó (fúzionáló) protoplasztok (sejtfal nélküli sejtek)

nak előállításán dolgozó N. K. Kao és Oluf L. Gomborg (1924–2007) kanadai (Saskatoon Prairie Regional Lab) csoportjában fajok közötti protoplasztfúzió (5. ábra) dolgozott. Röviddel ezután Dudits számos jelentős érdeklődést kiváltó sejthibridet készített, pl. répa és árpa, répa és humán, répa és farkasfű (*Aegopodium*) sejtek fúzióival. 1978-ban, a közelmúltban elhunyt kiváló citogenetikus, Hadlaczkó Gyula (1948–2013) segítségével, csoportjában szinkronizálták a búza, petrezselyem, répa stb. sejtek osztódását. Ezek a korai munkák vezettek ahhoz a felismeréshez, hogy egy mitózisba belépett sejt fúziója egy, a sejtosztódás interfázisában DNS-szintézist folytató partnerrel az utóbbiban indukálja a sejtmagi DNS korai kondenzációját, ami a részlegesen replikált DNS-t tartal-

mazó kromoszómák elvesztéséhez, illetve sérüléséhez vezet. Ebből kiderült, hogy a sejt-fúziós kísérletek sikerét a két partnersejt sejtcikluson belüli állapota is döntően befolyásolja (Fehér és Dudits 1994).

1975–85 között Maliga a kloroplasztiszok szerepét vizsgálta a sejthibridek inkompatibilitásában. Ehhez a kloroplasztisz DNS által kódolt riboszóma RNS génjeiben antibiotikum- (sztreptomycin-, linkomicin-) rezisztenciát eredményező mutációkat izolált. A sejt-fúzió előtt, a fogadó sejtben besugárzással vagy kémiai kezeléssel inaktíválta a kloroplasztiszokat. Így az antibiotikumrezisztencia segítségével szelektálni tudott a donorsejtekből bejuttatott életképes kloroplasztiszok funkciójára. Mivel a két szülő kloroplasztiszai és sejtmagjai közötti interferencia befolyásolhatja a sejthibridek életképességét, ezzel a módszerrel kiválasztható volt, hogy melyik partner kloroplasztisza legyen kombinálva a két szülő kromoszómakészletével. A sztreptomycin- és linkomicinrezisztens dohány mutánsok protoplasztfúziójával Maliga és munkatársai kettős antibiotikum-rezisztenciát mutató vonalakat is izoláltak, amelyekben megállapították, hogy a sejt-fúzió során a kloroplasztiszok között információcsere történt, ami DNS-eik rekombinációjához vezetett (Medgyesy et al. 1985).

Számos más, itt nem részletezett nemzetközi kutatási eredménynek köszönhetően (Fehér és Dudits 1994), az 1980-as években úgy látszott, hogy a növényi szomatikus sejthibridizálás egy lehetséges alternatívát biztosít a klasszikus, besugárzás és kromoszóma-transzlokációk citogenetikai azonosítását alkalmazó növény-nemesítésben. Szemben a citológiailag követhető kromoszómális jegyekkel, a protoplasztfúzióval nyert növényi sejthibridek előállítása során azonban továbbra is probléma maradt, hogy a fogadó növény kromoszómáiba beépülő idegen gének követésére nem álltak rendelkezésre jól jellemzett és szövettenyészetekben is követhető, anyagcsere-

hibát (auxotrófiát) vagy inhibitor vegyületekkel szembeni rezisztenciát biztosító génmutációk.

Ezzel szemben az emlős sejthibridek szelekcióját nagyban megkönnyítette a jól jellemzett mutáns sejtvonalak hozzáférhetősége. 1965-ös munkájukban, Ephrussi és Weiss pl. az egér-patkány sejthibridek elkészítéséhez John Littlefield-nek (Harvard Egyetem) azt az észlelését használták föl, hogy ha a nukleotidok szintézisét aminosavakkal blokkoljuk, akkor azok termelése csak egy kerülő úton lehetséges, amelyhez a timidinkináz (TK) és hipoxantin foszforibozil transzferáz (HPRT) enzimek szükségesek. Ezért egyik sejtfüziós partnerként egy *tk*-hibás tumor sejtvonalat használtak, amely nem tapadt le a sejttenyésztő edények falára, azaz nem mutatott kontakt gátlást. Ezt fuzionálták elölt Sendai vírus segítségével egy mutáns *hpert* gént hordozó, de kontakt gátlást mutató sejtrel. Aminopterin jelenlétében csak azok a hibrid sejtek osztoztak, amelyekben a partnerek vad *TK* és *HPRT* génjei kölcsönösen komplementáltak egymás *tk* és *hpert* mutációit (Ephrussi és Weiss 1965).

A sejthibridek szülői kromoszómái közötti rekombináció miatt gyakori a transzlokáció, delécio és inverzió, amely mitotikus hibákhoz, kromoszómaszám-vesztéshez vagy akár részleges kromoszómaszám-duplikációhoz (pl. triszómiához) vezethet. Citogenetikai vizsgálatokkal ezért lehetséges olyan mutációk kromoszómális helyzetének a meghatározása, amelyek sejtszinten azonosítható tulajdonságok megváltozásáért felelősek. Ilyen alapon térképezhetők pl. azok az onkogének is, amelyek a tumorsejtek kontakt gátlás nélküli gyors osztódásáért felelősek. 1975-ben ezt használta föl César Milstein (1927–2002) cambridge-i argentin sejtbiológus és német munkatársa, Georges Köhler (1946–1995) arra, hogy az ellenanyag-termelésért felelős, de nem tenyészhető B-limfociták (fehérvérsejtek) és gyorsan osztódó izomtumor mielőma sejtek fúziójával halhatatlanná tett (immortalizált) ellenanyag-termelő, ún. hibridóma sejtvonalat állítsanak elő (Köhler és Milstein 1975). Ez vezetett az ún. monoklonális ellenanyagok széles körű alkalmazásához a gyógyászatban és diagnosztikában. Emellett, Waclaw Szybalski és Elizabeth (Hunter) Szybalska (Szybalska és Szybalski 1962) már 1962-ben sikerrel komplementáltak egy inozit pirofoszforiláz mutáns humán sejt aminopterin érzékenységét vad típusú DNS-sel transzformálva azt. 1977-re pedig Frank L. Graham kidolgozta a kalcium-foszfát-kezelést alkalmazó transzformációs technikát is, amellyel egy timidinkináz gént hordozó herpes simplex vírus DNS-ével komplementált egy timidinkináz mutáns sejtvonalat (Bacchetti és Graham 1977).

A növényi protoplasztok sikeres DNS-transzformációjához az 1970-es években nem álltak még rendelkezésre hasonló sejtszinten szelektálható mutációk, gének vagy vírusvektorok. Továbbá a sejthibridek előállításához használt növényfajok többségében hiányoztak a kombinált tulajdonságok öröklődésének vizsgálatát segítő mutációk és genetikai térképek, amelyek pl. baktériumokban lehetővé tették a rekombináns DNS-technikákkal izolált gének egyszerű azonosítását. Ezért egyre nyilvánvalóbbá vált, hogy a molekuláris kutatásokhoz szükséges kiválasztani a növénybiológiában is egy olyan modellt, amelyben nagyszámú mutáció gyorsan előállítható, jellemezhető és térképezhető.

Egy gyomnövény, amely kivándorol Amerikába, hogy modellé válhasson

Szemben a nemesítők és citogenetikusok, köztük Rhoades és McClintock által előnyben részesített kukoricával, Laibach már az 1930-as években javasolta, hogy egy gyom, a lúdfű (*Arabidopsis thaliana*; 6. ábra) legyen a genetikai kutatások növényi modellje. Amint említettük, ezt a javaslatát a mutációs elméletre alapozva azzal indokolta, hogy a lúdfű sejtmagja és sejtmagi DNS-tartalma az egyik legkisebb a növényvilágban. Ezért a találatelmélet alapján a besugárzással indukált génmutációk várható gyakorisága elméletileg ebben a fajban a legmagasabb. Ezt PhD-hallgatójával, Erna Reinholz-cal



6. ábra. *Arabidopsis thaliana* (lúdfű), a molekuláris biológusok legfontosabb modellnövénye (Szabados László felvétele)

Laibach 1946-ban be is bizonyította több tucat röntgenbesugárzással nyert *Arabidopsis* mutáns jellemzésével (Reinholz 1947). A kukoricával összevetve, az *Arabidopsis* további óriási előnye az, hogy kis-méretű, vegetációs ideje alig három hónap, könnyen szaporítható laboratóriumi körülmények között, és több ezer utódot, magot produkál. 1955-ben Győrffy ezért irányítja Rédei figyelmét Laibach és Reinholz munkáira (Rédei 1992).

1956 elején a Laibach-tól kért magok megérkeznek, és Rédei éppen az *Arabidopsis* mutagenézisét tervezi, amikor október utolsó napjaiban a pesti harcok híreivel kapcsolatban komoly nézeteltérés alakul ki a martonvásári intézet liszenkóista vezetése és fiatal kutatói között. Az anekdota szerint, Rajki Sándor igazgatót Morganék korábban említett *A mendeli öröklés mechanizmusa* című könyvével bezárják a szobájába, hogy tanuljon. Miután föltűnnek az első orosz tankok, a kutatók és családjaik az intézet buszával elindulnak a csendes sopronhorpácsi nemesítő intézetbe. Keszthelynél azonban elkobozzák a csomagjaikat mondván, hogy azok nem szükségesek egy rövid szakmai kiránduláshoz. A csoport néhány nappal később átlépi a határt. Távozásuk miatt az otthonmaradók keményen megbüntetik, Rédei barátját, Kiss Árpádot félholtra verik. A menekülttáborból Rédei Missouri-Columbia egyetemére kerül, ahol legnagyobb örö-

mére megkapja Barbara McClintock üresen álló laboratóriumát Stadler röntgenkészülékével. Mivel csomag nélkül érkezik, az amerikai bevándorlásnál nem veszik észre, hogy zsebében ott lapulnak a féltve őrzött üvegfiolák Laibach *Arabidopsis* magjaival (Koncz 2006).

1957-től Rédei megkezdheti célkitűzésének megvalósítását, az *Arabidopsis* szal végzett genetikai vizsgálatokhoz szükséges mutációk izolálását. Először Luria és Delbrück fluktuációs tesztjét alkalmazza, és teszteli a röntgen- és ionizáló sugárzás, valamint különböző mutagén vegyületek hatásait. A mutagenézis-kísérletek optimalizálása után, Tatum és Beadle *Neurospora* kísérletei alapján, B1-vitamin (tiamin) bioszintézisben hibás *Arabidopsis* mutánsokat izolál 1962-ben. Ezzel előállítja az első ismert auxotróf növénymutánsokat. Ezek felhasználásával kidolgoz egy, a mutációs gyakoriság mérésén alapuló, rendkívül érzékeny mutagén tesztet. Ezután 60 tiamin auxotrófiát okozó mutációt 3 lókuszbba térképez az allélek közötti komplementáció és rekombináció alapján, hasonlóan Benzer T4 fág *rII* lókuszt térképezési kísérleteihez. A *py* (2,5-dimethyl-4-amino pirimidin szintézisét gátló) mutáció közelében izolál egy anyai gametofita (petesejt elhalását indukáló) mutációt, és kimutatja, hogy az szexspecifikusan, apai átvitelrel öröklődik. Több tucat levélmorfológiát (pl. *erecta*, aszimmetrikus és szörtelen) és szint megváltoztató mutáció fölhasználásával elkészíti az első részletes növényi kapcsoltsági térképet, amelyen öt gén egymástól való távolságát állapítja meg az *Arabidopsis* 2. kromoszómáján. 1962–66-ban számos virágzási időt megváltoztató mutációt izolál és térképez, majd azonosít egy immutánsnak nevezett lókuszt, amely mozaikos zöld levélszektorok megjelenéséért felelős. Rédei úgy gondolja, hogy az immutáns hasonló McClintock aktivátor (Ac) vagy mutátor (Spm) kontrolláló elemeihez. (2001-re derül csak ki, hogy az *IM* lókuszt egy olyan sejt-magi gén amely egy, a karotenoid pigmentek szintézisében szerepet játszó alternatív oxidázt kódol.) Ezt követi a klorofill-bioszintézisben hibás mutánsok jellemzése 1965–68-ban. Rédei 1972–73-ra azonosít három kloroplasztisz mutátor (*chm*) lókuszt is, amelyek Correns *Oenothera* és Rhoades kukorica *iojap* mutációihoz hasonlóan a kloroplasztisz működését gátolják. (Ezek funkciója a mai napig sem teljesen világos, mert a *chm* mutánsok a kloroplasztisz helyett a mitokondrium DNS-ben okoznak átrendeződést, de a *CHM* gén fehérjeterméke szükséges a transzláció helyes kezdéséhez mind kloroplasztisz, mind mitokondrium RNS-eken is.)

1956-tól az 1970-es évek végéig, Rédei (7. ábra) az egyetlen kutató, aki *Arabidopsis*-szal dolgozik az Egyesült Államokban. Európában Laibachon és Reinholzon kívül csak néhány genetikus foglalkozik, legtöbbször mellékesen, ezzel a németül fali kresszének



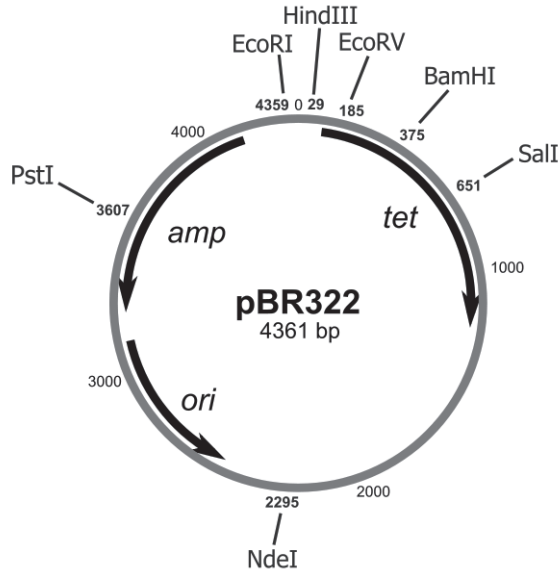
7. ábra. Rédei P. György (1921–2008), az *Arabidopsis* növény genetikai kutatásokban való felhasználásának úttörője

titulált kis gyomnövényvel. 1964-től Rédei kapcsolatot teremt az európai kutatókkal, kiadja az *Arabidopsis*-genetikusok periodikus lapját, az *Arabidopsis* Információs Szervizt, és megszervezi az első *Arabidopsis*-konferenciát 1965-ben Göttingenben. Ez után a holland Feenstra és van der Veen, a német Napp-Zinn, Röbbelen, Kranz és Müller, a cseh Veleminsky, Gichner és Cetyl, valamint a belga Jacobs és Bouharmont járulnak hozzá ahhoz, hogy az *Arabidopsis* fejlődési, virágzási, hormonális és anyagcsere-folyamatait érintő mutációk száma több százra emelkedjen. Röbbelen Göttingenben, Rédei az USA-ban, majd Kranz Frankfurtban összegyűjtik a lúdfű természetes változatait és rokonait, és a különböző génekben izolált mutációk komplementációs tesztje céljából mutánsaikat egymással kicserélik. Ugyan más növényfajokban, mint pl. kukorica, petúnia, oroszlánszáj (*Antirrhinum majus*) stb. is létezett számos jól jellemzett mutáció, a 1970-es évek végére a lúdfűvel végzett genetikai kísérletek fölbontóereje, egyszerűsége, gyorsasága és főleg olcsósága egyre nyilvánvalóbbá válik. Mivel az *Arabidopsis* nem egy haszonnövény, Rédei az USA-ban nem kap érdemi támogatást kutatásaihoz. Elkészítésében 1970-ben egy 151 oldalas cikkben összefoglalja addigi munkájának eredményeit, majd 1975-ben egy következő áttekintő cikkben ismerteti az *Arabidopsis*-szal végzett genetikai kutatások más növényekhez hasonlított jelentős előnyeit (Rédei 1970; Rédei 1975). Akkor még nem gondolja, hogy ezek az inkább hattüdőlnak készült enciklopédikus munkák a növényi molekuláris genetika startköveivé válnak.

A genetikai mérnökség a biológiai kutatások alapeszközévé válik

A II. világháborút követően újraéledő európai tudományos iskolák körül a DNS-modell közlését követően gombaszámra szaporodnak az új molekuláris biológiai laboratóriumok. 50 éve, John Kendrew (1917–1997) és Conrad Waddington (1905–1975, a sejt- és szervdifferenciálódás genetikai vizsgálatait megalapozó angol kutató) kezdeményezése nyomán 1964-ben nemzetközi összefogással megalakult Heidelbergben az Európai Molekuláris Biológiai Szervezet (EMBO) és annak központi laboratóriuma. 1971-től, az SZBK-ban a Venetianer Pál vezette Nukleinsav Csoport munkájának köszönhetően, a rekombináns DNS-technikák, a génszézés alkalmazása hazánkban is lépést tart a tudomány nemzetközi fejlődésével. A DNS-molekulákat meghatározott szekvenciáknál hasító első endonukleázok fölfedezését követően, 1982-ben már közel száz különböző felismerőhelyű enzimmel lehet DNS-fragmenteket izolálni, majd ezeket plazmid, fág vagy vírus DNS-ekbe beépíteni és ezáltal az általuk hordozott gének tulajdonságait, szabályozását és szekvenciáit tanulmányozni. Ennek köszönhetően számos plazmid, fág és episzóma által hordozott bakteriális gén szekvenciája ismertté válik, majd 1982-re Sanger csoportja elkészíti a λ fág DNS-ének teljes szekvenciáját is (Sanger et al. 1982).

1974-ben John Shine és Lynn Dalgarno ausztrál kutatók felfedezik, hogy a kóli 16S riboszóma RNS 3'-végén található egy olyan régió, amely bázispárosodni tud (komplementer) az mRNS-eken az ATG kezdő kodontól nyolc nukleotid távolságban elhelyez-



8. ábra. A pBR322 plazmid vázlatos térképe néhány egyedi restriktációs endonukleáz-hasítóhely feltüntetésével

kedő riboszómakötő AGGAGG szekvenciákkal (Shine és Dalgarno 1974). 1975-ben David Pribnow (Harvard) és Heinz Schaller (Heidelberg) a kóli T7 és fd fágok génjeinek vizsgálata során megállapítják, hogy a bakteriális RNS-polimeráz a gének transzkripció kezdőpontjai előtt tíz nukleotiddal elhelyezkedő konzervált TAATAT szekvenciákhoz, ún. Pribnow-boxokhoz kötődik. További konzervált, transzkripciót szabályozó szekvenciákat találnak az ehhez közeli -35 régióban is (Pribnow 1975; Schaller et al. 1975). A bakteriális gének expresszióját szabályozó promóter régiók fúziója idegen génekkel, illetve mRNS-ekről készített cDNS-ekkel lehetővé teszi az azok által kódolt fehérjék szintézisét és vizsgálatát kóliban és más baktériumokban.

A promóterek és fehérjét kódoló gének, illetve cDNS-ek egyszerű összekapcsolását számos új plazmid elkészítése is segíti. Ezek között az egyik legnépszerűbb a pBR322 vektor (8. ábra), amelyet 1977-ben Boyer két mexikói munkatársa, Francisco Bolivar és Raymond Rodriguez hoz létre két antibiotikumrezisztencia-gén beépítésével a kóli ColE1 plazmidjába (Bolivar et al. 1977). A pBR322 antibiotikumrezisztencia-génjeiben található endonukleáz hasítóhelyekre a DNS-fragmenteket több enzim kombinációjával is be lehetett építeni és ezt a folyamatot az antibiotikum-rezisztencia elvesztésével követni.

Ugyanebben az időben az óriási tempóban haladó fággenetikai vizsgálatok földerítik, hogy a λ , fd és egyéb kóli fágok számos génje nem szükséges a fágok szaporodásához, és ezért helyettesíthető idegen DNS-sel (Chauthaiwale et al. 1992). Így pl. a λ -fág származékainak hasítóhelyeire 12–15 kb (kilobázis = ezer bázispár) mé-

retű idegen DNS-t lehet beépíteni DNS-ligáz segítségével, majd kóli transzformáció után fág formában fölszaporítani. 1977-re a bázeli Friedrich Miescher Intézetben dolgozó Barbara Hohn kidolgoz egy módszert, amellyel a rekombináns λ DNS fág kapszulába csomagolható kóli fehérje extraktumokban (Hohn és Murray 1977). Ez lehetővé teszi bármely organizmus összes génjét hordozó DNS-fragment-könyvtárak elkészítését kóliban. 1978-ban John Collins braunschweigi biológussal együtt átépítik a becsomagoláshoz szükséges λ DNS ragadós (kohezív vagy *cos*) szekvenciáit a pBR-plazmid vektorokba (Collins és Hohn 1978). Az így létrehozott kozmidokban nagyobb, kb. 40 kb méretű DNS-fragmenteket lehet λ -fág kapszulába csomagolva kóliba juttatni.

A nitrocellulóz filterekre kötött fág és kozmid DNS-ek izotóp jelölt DNS-próbákkal végzett hibridizációja megkönnyíti olyan gének azonosítását, amelyek más fajokból már ismert génekhez hasonló homológ DNS-szekvenciákat hordoznak. Ugyanígy azonosítani lehet a kromoszómák fág vagy kozmid vektorokba épített, egymással átfedő DNS-fragmentjeit. Ez lehetővé teszi a „kromoszómán sétálva” a lineáris sorrendben egymást követő gének fizikai térképének elkészítését. A *lac* és egyéb bakteriális promótereket hordozó λ és plazmid vektorokban bármely organizmus teljes mRNS készletéről reverz-transzkriptázzal készített cDNS-könyvtárat is föl lehet szaporítani. A cDNS-ek kódoló régióit pl. a LacZ β -galaktozidáz enzim génjével fuzionálva egy ismert fehérje elleni ellenanyaggal ki lehet keresni a könyvtárakból azokat a cDNS klónokat, amelyek az ellenanyag által fölismert fehérjét kódolják.

A *lac* operon elemeinek molekuláris jellemzése leegyszerűsítette a DNS-szekvenálás akkori bonyolult műveleteit is. Benno Müller-Hill, aki 1966-ban Walter Gilberttel izolálta a LacI represszort (Gilbert és Müller-Hill 1966), kölni munkatársával 1972-ben elkészítette a Lac represszor aminosav-szekvenciáját, és meghatározta, hogy az hogyan kötődik a *lac* operátor DNS-szekvenciáihoz (Adler et al. 1972). 1977–80-ban Joachim Messing a müncheni Max-Planck Intézetből és Bruno Gronenborn Müller-Hill kölni csoportjából a kóli M13 fág DNS-ébe épített egy *lacZ* minigént. DNS-fragmentek beépítése, klónozása a *lacZ* génbe épített hasítóhelyekre egyszerűen követhető, mert a fág plakkok a *lacZ* riporter gén inaktiválása miatt kék helyett fehér színűek lesznek (Messing et al. 1977).

A korabeli DNS-szekvenálási technikákkal csak max. 200–400 nukleotid sorrendjét lehetett pontosan meghatározni. Mivel a Sanger-féle DNS-szekvenálási módszer az egyszálú DNS-templátokhoz hibridizáló oligonukleotidok DNS-polimerázzal történő meghosszabbításán alapult, a szekvenálás előtt szükséges volt a DNS-templátok két szálának elválasztása. A DNS-szálak első preparatív elválasztási módszerét Φ X174 fág DNS-sel az SZBK Növényélettani Intézetének akkori munkatársa, Szalay Aladár dolgozta ki Sinsheimer laboratóriumában 1977-ben (Szalay et al. 1977). Az M13 vektorok használata nemcsak megkönnyítette a fág és kozmid vektorokban klónozott DNS-szakaszok fölbontását kisebb méretű fragmentekre, de egyben alkalmas egyszálú DNS-templátot biztosított a szekvenáláshoz is. (Az M13 fág a kóli F szexfaktor pilusait felismerve szaporodik. A szexfaktor hiányában DNS-e kettős szálú cirkuláris formában fölhalmozódik, és plazmidként izolálható DNS-fragmentek be-

építése céljából. A cirkuláris kettős szálú M13 DNS-ről szintetizálódó egyszálú DNS azonban a fág kapszulába csomagolva F-faktort hordozó kólin plakkot formál, amelyből könnyen kinyerhető.)

1981-ben Khorana korábbi foszfor-diészter DNS-szintézis módszerét fölváltják a foszfor-amidit nukleozidokat használó új szintézistechnikák (Beaucage és Caruthers 1981), amelyek lehetővé tették az oligonukleotidok szintézisének automatizálását. Az egyszálú M13 DNS-be épített DNS-fragmentek szekvenálásához így könnyen lehetett olyan oligonukleotidokat is szintetizálni, amelyek a már korábban elkészített DNS-szekvenciák végeihez hibridizáltak, megengedve a szekvenciák gyors további leolvasását. Az M13 DNS-hez olyan oligonukleotidokat is lehetett hibridizálni, amelyek a klónozott DNS-szekvenciáktól néhány nukleotidban eltértek. Így az oligonukleotidokon DNS-polimerázzal indított DNS-szintézis segítségével a fágok által hordozott idegen gének promóter, kódoló stb. régióiba pontmutációkat, kisebb deléciókat és inszerciókat lehetett beépíteni és ezzel a helyspecifikus mutagenézis módszerrel a módosított gének funkcióit vizsgálni. Ehhez természetesen a DNS-fragmenteket később át kellett építeni olyan vektorokba, amelyek azok bevitelét lehetővé tették a géneket eredetileg hordozó organizmusokba.

Az élesztő *Leu2*, illetve *His3* génjeit hordozó ColE1 plazmid vektorokkal Gerald Finknek és munkatársainak (Whitehead Intézet) köszönhetően 1978-ban lehetővé vált a pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) leucin és hisztidin aminosav auxotróf törzseinek transzformálása (Hinnen et al. 1978). Az élesztő gének módosítása homológ rekombinációval megnyitotta az utat a génfunkciók tanulmányozásához ebben az egysejtű eukarióta modellorganizmusban is. A fejlődés tempóját érzékelteti az a tény, hogy már 1981-ben megjelenik az első *Élesztő molekuláris biológiája* elméleti-módszertani enciklopédia (Strathern et al. 1981), amely 1991-re több ezer oldalra bővül.

A génfunkciók mutációs vizsgálatait nagyban egyszerűsítette az „ugráló gének”, az inszerciók elemek és transzpozonok fölfedezése baktériumokban. 1968–72-ben James Shapiro chicagói, illetve Peter Starlinger és Heinz Saedler kölni kutatók azonosítottak egy olyan mutációt a kóli galaktóz (*gal*) operonjában (Starlinger és Saedler 1972), amely a galaktóz fölhasználására képtelen mutáns sejtek között nagy gyakorisággal galaktóz fölhasználására képes utódok, spontán revertánsok megjelenését okozta. Az instabil *gal* lókuszt hordozó transzdukáló λ fág DNS-ének vizsgálata kiderítette, hogy az egy kb. 2 kb méretű inszerciót hordozott. Ennek az IS1-nek nevezett inszerciók elemnek a végein két rövid, fordított (invertált) sorrendű határszekvenciát azonosítottak, amelyek egy fehérjét kódoló gént fogtak közre. Mivel ennek a génnek a mutációja meggátolta, hogy az IS1 elem kivágódjon a mutáns *gal* génből, kiderült, hogy az egy olyan enzimet, ún. transzpozázt kódol, amely az IS1 elem végein található invertált határszekvenciákat fölismerve kivágja azt a *gal* génből, és képes hasonló szekvenciák fölismerésével más génekbe beépíteni.

A kóli *gal* génjébe integrálódó IS1 elem megismerése után röviddel David Botstein (Massachusetts Institute of Technology, MIT) laboratóriumában Nancy Kleckner 1975-ben fölfedez egy olyan mozgásra képes DNS-szakaszt, amely a *Salmonella* kromoszómából ugrott át egy azzal nem kapcsolt (azaz transz helyzetű) DNS-moleku-

lába, a P22 fág DNS-ébe (Kleckner et al. 1975). Az ennek alapján transzpozonnak nevezett új ugráló elem egy tetraciklinrezisztencia-gént hordozott két invertált IS elem között. Ezért DNS-be történő beépülését és kivágódását az IS elemen kódolt transzpozáz szabályozta. 1983-ra a Shapiro által szerkesztett *Mozgó elemek* című enciklopédia (Shapiro 1983) az IS elemek és transzpozonok elképesztő természetes variációját és konzervált működési mechanizmusait ismertette. Emellett tárházát szolgáltatva azoknak a molekuláris genetikai eljárásoknak, amelyekkel a baktériumok minden génjét IS- vagy transzpozon-inszerciókkal meg lehetett jelölni és azok funkcióit a génmutációk segítségével azonosítani. Ez óriási mértékben fölgyorsította a gének izolálását és szekvenálását az ismert transzpozonok és hibridizációs módszerek segítségével. Ugyanakkor nyilvánvalóvá vált, hogy a McClintock által 1950-ben leírt *Ac/Ds* és *En(Spm)* kukorica kontrolláló elemek genetikai tulajdonságai rendkívül hasonlóak a bakteriális transzpozonéhoz, ami kiindulópontként szolgált a növényi transzpozonok izolálását célzó molekuláris kutatásokhoz.

A mozgó elemek vizsgálata azt is kiderítette, hogy a legtöbb episzóma, plazmid és több transzdukáló fág (pl. a kóli Mu fágja) hordoz egy transzpozáz kódoló IS elemet vagy transzpozont, amely a kromoszómába való beépülésüket biztosítja. A plazmidokon kódolt konjugációhoz szükséges enzimek és szekvenciák tanulmányozása földerítette, hogy a plazmid gének egy része szükséges a baktériumok közötti szexcsatornákat, pilusokat fölépítő transzfer (Tra) fehérjék szintéziséhez. A konjugáció molekuláris mechanizmusainak vizsgálata alapján ismertté vált, hogy a plazmidok kódolnak egy olyan pilóta fehérjét, amely a plazmid DNS-en egy specifikus szekvenciát ismer föl, az ún. konjugációs transzfer origót (*oriT*-t), majd ott a DNS egyik szálát elhasítja, majd annak 5' végéhez kovalensen kapcsolódik. Ezt követően, az *oriT*-től meginduló DNS-szintézis kiszabadítja és helyettesíti a pilóta fehérjéhez kötött egyszálú plazmid DNS-t, amely a mobilizáló (*mob*) pilóta fehérje segítségével a szexpilusokon átjut a fogadó baktériumba. Ott a pilóta fehérje az átkonjugált egyes szálú plazmid DNS-t körre zárja, majd azon DNS-replikációval egy új szál szintetizálódik, helyreállítva a cirkuláris plazmid DNS kettős szálú struktúráját (Lanka és Wilkins 1995).

Szemben a plazmidokkal, a legtöbb transzpozon nem képes önálló replikációra. Így kivágódásuk gyakran helyreállíthatja a transzpozont hordozó gén eredeti funkcióját. A transzpozonok kivágódása során a DNS-ben kettős szálú hasítás történik, és a szabad DNS-végek egy javítási (DNS-reparatúra) folyamat során újra összekapcsolódnak. A javítási folyamat gyakori hibái (pl. a DNS-végeket lerágó enzimek, exonukleázok aktivitása) miatt azonban kisebb deléciók, stabil génmutációk is keletkezhetnek. Más esetekben, a kivágódási és javító folyamatok eredményeként, az elvágott gazda vagy transzpozon DNS-végeiről rövid szekvenciák lemásolódnak és bennragadnak, ún. lábnyomokat hagynak a transzpozon kivágódása után a gazdagénben. Végül a kromoszóma DNS-be épült transzpozon a kromoszóma replikációja során kivágódhat úgy is, hogy közben egy kópiája az eredeti helyén marad, míg az új kópia egy másik génbe integrálódik.

A transzpozáz, hasonlóan a konjugációs *mob* pilóta fehérjéhez az IS elemek végeihez kötődik. Az IS elemeket hordozó plazmid, ha az IS elemnél vágódik el a transzpo-

záz aktivitásának köszönhetően, beépülhet a kromoszóma DNS-be is. Ez gyakran akkor történik meg, amikor a plazmid az új gazdában nem képes replikálódni, pl. mert a gazda hordoz egy hasonló plazmidot, amely az újonnan bejutó plazmid replikációját gátolja. A plazmidok közötti inkompatibilitás mellett előfordul az is, hogy az egyik plazmid konjugációs mob fehérjéje fölismeri egy másik plazmid oriT szekvenciáját, és képes azt más gazdába mobilizálni. Azaz egy oriT szekvenciát hordozó plazmid akkor is mobilizálható új gazdába, ha az azt fölismerő mob fehérje génje egy másik plazmidon vagy a kromoszómában helyezkedik el, és fordítva. Ezért az IS elemek által a kromoszómába épített oriT szekvenciát hordozó plazmidok a mob fehérje termelésével átalakíthatók egyszálú konjugatív formába, és az oriT kezdőponttól mobilizálhatják a gazda kromoszómális DNS-ét is egy másik baktériumtörzsbe. Ezek a folyamatok a bakteriális kromoszómák gyors változásához, evolúciójához vezetnek, amely nagy szerepet játszik a baktériumok betegségeket okozó génjeinek, fehérjeinek gyors átalakulásában és elterjedésében.

Természetes génátvitel agrobaktériumból növényekbe

Az első fejezetben megemlítettük, hogy a sejtbiológiai és genetikai kutatások egyik legjelentősebb motivációs tényezője az állatokban és embereknél gyakori tumorbetegségeket okozó faktorok és gének megismerése volt. A tumorvírusok és sejthalhatatlanságot okozó génmutációk vizsgálatát, a rákkutatást a molekuláris módszerek elterjedése óriási mértékben fölgyorsította és segítette. Az állati és humán tumorokhoz hasonlóan a növényi tumorokért felelős faktorok vizsgálata is a 19. század végén kezdődött. 1907-ben Smith és Townsend megállapította, hogy a természetben észlelt növényi tumorok többségének kialakulásáért baktériumok felelősek, és ezek között a leggyakoribb az *Agrobacterium tumefaciens* talajbaktérium (Smith és Townsend 1907). Az ezt követő sugár- és kémiai mutagenézis tanulmányok ahhoz a meglepő megállapításhoz vezettek, hogy a növényekben, szemben az emlősökkel és emberrel, az indukált génmutációkra visszavezethető természetes, ún. genetikai tumorok rendkívül ritkák (Kahl és Schell 1982).

A növények gyökérkoronáján (a szárát és gyökeret elválasztó átmeneti régióban) előforduló „koronagubacs” tumorokat okozó agrobaktérium vizsgálata során Armin C. Braun (1911–1986), a New York-i Rockefeller Egyetem botanikusa 1941-ben kimutatta, hogy az agrobaktérium eltávolítása után a steril növényi tumorszövetek hormonmentes táptalajon meghatározatlan ideig osztoznak, azaz „halhatatlanok” (Braun 1941). 1950-ben Braun az agrobaktérium-fertőzéshez a magas hőmérsékletet jól tűrő madagaszkári rózsás meténget (*Vinca rosea/Catharanthus roseus*) választotta gazdának. Azt tapasztalta, hogy az agrobaktérium indukálta növénytumorkialakulása hőkezeléssel gátolható. Ezért föltételezte, hogy az agrobaktérium valamilyen hőérzékeny tumor-indukáló princípiumot (tulajdonságot), TIP-et visz át (transzformál) a növényi sejtekbe, amely a sejtosztódást serkentő auxin és citokinin növényi hormonok termelését irányítja (Braun 1950).



9. ábra. Jeff Schell (1935–2003) és Marc van Montagu belga kutatók, az *Agrobacterium tumefaciens* tumorindukáló plazmidjának felfedezői

1967-ben Jeff Schell (1935–2003) és Marc van Montagu belga kutatók (9. ábra) a genti egyetemen genetikai módszerekkel megkezdtek a Braun által föltételezett agrobaktérium TIP keresését (Schell és Koncz 2000). Mivel mindketten jártasak voltak a fággenetikában, és ismerték Hersey és Chase, valamint az Avery-csoport második fejezetben említett kísérleteit, világos volt számukra, hogy a TIP csak egy olyan DNS-molekula lehet, amelyet a kórokozó agrobaktériumok a növényi sejtekbe juttatnak. Francia kollégáik, George Morel, Annik Petit és Jacques Tempé 1970-ben fölfedezték, hogy a különböző agrobaktérium-törzsek által indukált tumorok sajátos arginin aminosav származékokat, ún. opinokat (pl. oktopin, nopalin stb.) termelnek, amelyeket az agrobaktériumok egyedüli szén- és nitrogénforrásként tudnak hasznosítani. Ezért feltételezték, hogy az agrobaktériumból a növénybe jutó DNS hordoz opinok szintéziséért felelős géneket, amelyek az opinok termelésén át szelektív szaporodási előnyt biztosítanak az azokat hasznosító, tumorokban élő agrobaktérium-törzseknek. 1971-ben Allen Kerr ausztrál mikrobiológus az adelaide-i egyetemen azonosított egy nem fertőző, avirulens agrobaktérium-törzset, és abból egy antibiotikum-rezisztens mutánst készített. Ezt összekeverve egy tumorindukáló agrobaktérium-törzsszel növényeket fertőzött, majd a tumorokból visszaizolálta az avirulens törzset. Hasonlóan Griffith korábban említett *Pneumococcus* kísérletéhez, azt találta, hogy a tumorindukációért felelős tulajdonság, a TIP megjelent az avirulens törzsből, amely ezáltal képes lett növényi ráksejteket indukálni.

Schell és Montagu fággenetikai ismereteik alapján eredetileg arra gyanakodtak, hogy a TIP egy lizogén fág. 1970-re azonban ezt a lehetőséget kizárták, mert a különböző tumorindukáló agrobaktérium-törzsek nem ugyanazokat a fágokat hordozták. A fág DNS-ek tisztítására használt cézium-klorid gradienseken azonban azonosított-

tak két nagy cirkuláris plazmid DNS-t az agrobaktérium B6 és C58 törzsekben, amelyek eltérő opinok, oktopin (B6) és nopalín (C58) szintézisét indukálták a növényi tumorokban. Ezután a kórokozó törzseket 37 °C-on tenyésztve sikerült nekik olyan nem patogén (B6S3 és C58C1) származékokat előállítani, amelyek a tumorindukáló képesség TIP elvesztése mellett érzékenységet mutattak az *A. radiobacter* törzs agrocín 84 toxinjával, illetve az AP1 fág fertőzésével szemben, és nem tudtak oktopin vagy nopalín tartalmú táptalajon nőni, mert elvesztették az opinok lebontásáért felelős géneket. A hőkezelt (kúrált) törzsek vizsgálata kimutatta, hogy a felsorolt tulajdonságok megváltozását a B6, illetve C58 törzsekben található két nagy plazmid egyikének, a tumorindukáló pTiB6, illetve pTiC58 plazmid elvesztése okozta. Kerr kísérletét megismételve az avirulens B6S3 törzset összekeverték a kórokozó nopalín C58 törzsszel, és fordítva, a C58C1 törzset a virulens oktopin B6 törzsszel, majd a keverékekkel indukált tumorokból visszanyerték a specifikus antibiotikum-rezisztenciával jelölt B6S3 és C58C1 törzseket. Azt tapasztalták, hogy a baktériumok többsége újra rezisztenciát mutatott az agrocín 84 toxinnal és AP1 faggal szemben, és az oktopin törzsből származó B6S3 képes volt nopalint, míg a nopalín törzsből származó C58C1 törzs oktopint degradálni. Ezek a baktériumok tartalmazták a másik törzs pTiC58, illetve pTiB6 plazmidját és képesek voltak nopalín-, illetve oktopintermelő tumorokat indukálni.

Ezzel bebizonyosodott, hogy a növényi tumorok indukációjáért a Ti plazmidok a felelősek, amelyről éppen 40 évvel ezelőtt, 1974-ben számolt be először Schell genti csoportja (Zaenen et al. 1974). Felfedezésük logikusan azt is magába foglalta, hogy az agrobaktériumok Ti plazmidjain kódolt opin, illetve auxin és citokinin növényi hormonok termeléséért felelős gének bejutnak a növényi sejtekbe, és ott stabilan fennmaradnak és kifejeződnek. Ebből következett az a föltételezés, hogy az agrobaktériumokkal transzformált növényi sejtek kromoszómáiba be kell épülnie az említett Ti plazmidokon lokalizált géneknek.

Schellék korszakalkotó fölfedezése 1974-ben könnyen elkerülhette volna a növénybiológusok figyelmét, mert egy másik belga kutató, Lucien Ledoux a liège-i egyetemről az 1960-as évek közepétől számtalan cikkében azt állította, hogy a növényi szervek és szövetek fölveszik és integrálják a bakteriális, élesztő és humán DNS-eket. 1974-ben egy nagy figyelmet keltő Nature-cikkben Ledoux és munkatársai közölték, hogy Rédei tiamin igényes *Arabidopsis* mutánsait sikeresen komplementálták egy olyan transzdukáló λ -fág DNS-ével, amely a kólibaktérium tiamin bioszintézis génjeit hordozta (Ledoux et al. 1974). Ez az eredmény azt is sugallta, hogy a bakteriális gének probléma nélkül kifejeződnek növényekben. Ledoux és követői még két éven át öntötték hasonló fölfedezéseiket. 1976-ban Ledoux-t meghívták egy, a szegedi SZBK-ban megrendezett növényi sejtgenetikai kongresszusra, amelyen a terület sok vezető kutatója megjelent, köztük Melchers, Cocking és Rédei is. Egy rövid, de annál megdöbbentőbb előadásban Rédei precíz genetikai kísérletekkel bebizonyította, hogy Ledoux kóli génekkel komplementált *Arabidopsis* mutánsa nem hordozta a Rédei által a tiamin lókusokban eredetileg izolált mutációkat, habár állítása szerint Ledoux ezeket használta kísérleteiben (Rédei et al. 1976). Ezzel a nyilvános megszégyenítéssel véget ért egy

közel egy évtizedes sötét korszak, és megkezdődött annak vizsgálata, hogy az agrobaktérium Ti plazmid által biztosított természetes génátviteli mechanizmus hogyan használható föl az égetően hiányzó növényi transzformációs módszer kidolgozására.

A transzferált DNS (T-DNS) és a molekuláris növénybiológia megszületése

1974-től hatalmas verseny alakult ki Schell és Montagu genti csoportja, valamint Eugen W. Nester (Washington Egyetem, Seattle) és Rob Schilperoort (1938–2012) leideni laboratóriumai között, hogy kimutassák a Ti plazmid DNS-ének jelenlétét a növényi tumorokban. Ehhez először elkészítik a Ti plazmidok restriktációs endonukleáz fragmentjeinek fizikai térképeit, és azokat kóli plazmid vektorokba építik a fent leírt módon, majd a Ti plazmid DNS-ek P³² foszforizotóppal jelölt fragmentjeit hibridizálják hasonló endonukleázokkal emésztett tumor DNS-ekkel. 1977-ben Nester munkatársa, Mary-Dell Chilton közli először, hogy a Ti plazmid egyes fragmentjei megtalálhatók a növényi tumorok DNS-eiben (Chilton et al. 1977). 1978-ban Schell és Chilton csoportjai meghatározzák az oktopin és nopalín Ti plazmidok fizikai térképén a növények kromoszómaiba beépülő transzferált DNS- (T-DNS-) szakasz pontos helyzetét (Chilton et al. 1978; Depicker et al. 1978). Ezek után gyorsan pörögnek az események, és több száz közlemény jelenik meg rövid egy év alatt a T-DNS-en található gének azonosításáról, azok mutációival nyert tumorok fenotípusáról és új opin-szintézisért felelős gének azonosításáról.

1978-tól Schell átveszi a kölni növénynemesítési Max Planck Intézet (MPIZ) vezetését, ahol az IS elemek kutatásában kiemelkedő szerepet játszó Saedler és Starlinger mellett együttműködik Müller-Hill korábbi munkatársaival, valamint az SZBK-ból 1979-től rendszeresen kilátogató hazai kutatókkal is. Schell a magyar kutatóknak egy külön „Szeged” laboratóriumot létesít, amely csereegyezmények keretében 25 éven át segíti a hazai növényi molekuláris biológia fejlődését. Ide látogat rövidebb-hosszabb ideig a szegedi SZBK-ból Kondorosi Ádám (1946–2011) és Kondorosi (Kuzsel) Éva is, akik 1980–84-ben kimutatják, hogy az agrobaktériummal rokon *Shinorhizobium meliloti*, amely a lucernán a nitrogénfixáló gümők létrehozásáért felelős, hordoz egy Ti plazmiddal részleges homológiát mutató nagy plazmidot. Ezen a szimbiotikus nitrogénfixálásért felelős Sym plazmidon lokalizálják a gümőképzésért felelős, ún. nodulációs (*nod*) és nitrogénfixáláshoz szükséges nitrogenáz (*nif*) géneket. Azonban kiderül, hogy szemben az agrobaktérium Ti plazmidokkal, a *Shinorhizobium* Sym plazmidjáról nem épül be genetikai információ a növények kromoszómaiba (Kondorosi et al. 1991).

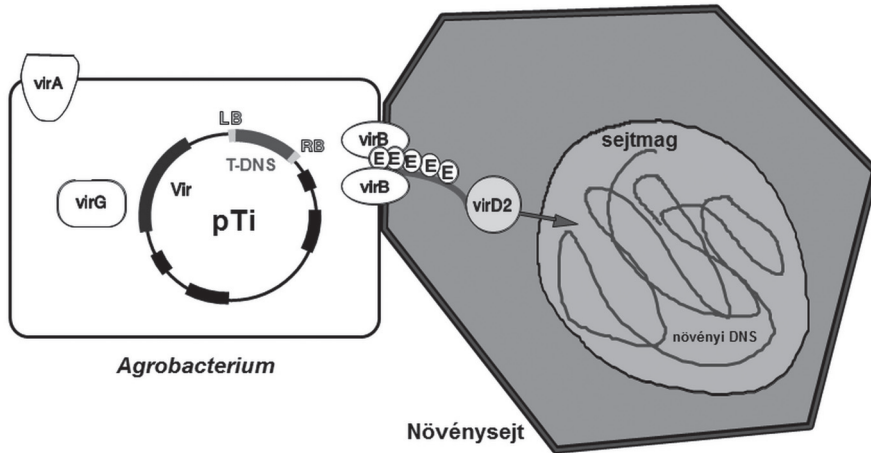
Az agrobaktérium T-DNS génjeinek vizsgálata igazolta Braun feltételezését, hogy a TIP auxin és citokinin hormonok, valamint opinok bioszintéziséért felelős enzimek génjeit juttatja a növényi tumorokba. Bár ezekről a génekről baktériumokban is észlelhető fehérjeszintézis, mégis a növényi tumorokban a T-DNS génjeiről tipikus poliA farokkal rendelkező eukarióta mRNS-ek szintetizálódnak. Ezek 5' végét, az élesztő, emlős és humán sejtek mRNS-eihez hasonlóan, egy 7-metilguanozin-csoport védi.

1980-ban Schell és Montagu genti csoportja kimutatja, hogy a T-DNS nopalinszintáz (*nos*) génjébe beugratott *Tn7* transzpozon a T-DNS-sel beépíthető növényi tumorok DNS-ébe, és ezzel igazolja, hogy a T-DNS fölhasználható transzformációs vektorként idegen gének bejuttatására növényi sejtekbe (Hernalsteens et al. 1980).

Mivel a T-DNS gének mRNS-eit térképező kölni Lothar Willmitzer *Tn7* szekvenciákkal hibridizáló RNS-t észlelt a tumorokban, fölmerült az a kérdés, hogy Ledoux-t igazolva esetleg a bakteriális gének mégis kifejeződhetnek növényekben. Ennek tesztelésére a fejezet szerzője a T-DNS nopalinszintáz génjébe építi a pBR322 plazmid egyik módosított származékát. Mivel ez a plazmid nem tud replikálódni agrobaktériumban, a kőiből átkonjugált pBR322 vektorok génjei egy lépésben beépíthetők a T-DNS-be az ott található homológ DNS-szekvenciákkal történő rekombinációval. Így számos antibiotikum-rezisztencia gén, valamint a csirke ovalbumin és α -aktint kódoló gének transzformációja után megvizsgálható vált azok transzkripciója, illetve az általuk kódolt fehérjék szintézise dohány tumorsejtekben. Ezek a kísérletek egyértelműen kiderítették, hogy a bakteriális gének nem fejeződnek ki növényi sejtekben. Az eredmény nem volt nagyon meglepő, mert 1974-től Roger D. Kornberg és Robert G. Roeder úttörő kutatásainak köszönhetően ismert volt, hogy az eukarióta sejtekben a hisztonok alkotta nukleoszómákra tekert DNS-t több különböző RNS-polimeráz írja át (Roeder és Rutter 1969; Kornberg 1974). A bakteriális RNS-polimerázokkal szemben, a sokkal több alegységet és szabályozó faktort tartalmazó, fehérjét kódoló géneket átíró RNS-polimeráz II enzim az eukarióta géneken lényegesen komplexebb promóter szekvenciákat és az azokhoz kötődő transzkripció faktorok komplexeit ismeri föl. Bár ezek részletes megismerése Kornberg, Roeder és sok más kutató részvételével csak az 1990-es évekre következett be (pl. Kelleher et al. 1990; Fondell et al. 1996), nyilvánvalóvá vált, hogy a bakteriális gének expressziójához olyan promóter és poliA farok szintézisét irányító, ún. terminációs szekvenciákat kell fölhasználni, amelyeket a növények RNS-polimeráz II enzime képes fölismerni.

A kezdeti növénytranszformációs kísérletek azt is jelezték, hogy az állati génekről készülhet ugyan mRNS a növényi sejtekben, de azok mérete és egyéb sajátosságai nem egyeznek meg az ugyanazokról a génekről állati sejtekben termelt mRNS-ek tulajdonságaival. Ezért pl. a csirke ovalbumin génről nem készült helyes fehérje dohánysejtekben (Koncz et al. 1984). 1977-től, Phillip Sharp és Richard J. Roberts észlelései alapján (Berget et al. 1977; Chow et al. 1977) köztudott volt, hogy a humán adenovírushoz hasonlóan egyes élesztő és a legtöbb akkor ismert állati és humán gén fehérjét kódoló régióját félbeszakítják olyan intronnak nevezett nem kódoló szekvenciák, amelyek a transzkripció során kivágódnak a készülő mRNS-ből. Az intronok hibás kivágódása (a „splicing” angol terminológia alapján ferdített „szplájszolás”) az állati génekről növényben szintetizált mRNS-ekből azt jelezte, hogy a kivágódást szabályozó kis U RNS-ekből és kb. 600-800 fehérjéből fölépülő spliceoszóma funkciói (Will és Lührmann 2011), valamint az intronok fölismerésének egyes mechanizmusai különböznek növényi és állati sejtekben.

Az auxin (indolecetsav) bioszintézisért felelős *iaaH* (indolacetamid-hidroláz) és *iaaM* (triptofán-monooxigenáz), és a citokinin hormon szintézisét irányító *ipt* (iso-



10. ábra. A talajlakó növénypatogén *Agrobacterium* saját DNS-ét a növényi sejtbe bejuttatva és a sejtet „átprogramozva” alakítja ki a szaporodását elősegítő tumor kialakulását a növényen. A bakteriális virulencia (vir) fehérjék segítségével a tumorindukáló plazmidon (pTi) a határszekvenciák által (LB, RB) kijelölt transzfer-DNS-szakasz (T-DNS) átjut a növényi sejtbe, majd beépül a növényi genomba (Szabados László ábrája)

pentenil-transzferáz) T-DNS gének mutációs vizsgálatai kiderítették, hogy az *iaa* gének inaktiválása megemeli a citokinin:auxin arányt, amely hajtások fejlődését indukálja a T-DNS-sel transzformált tumorsejtekből. Az *iaa* gének mutációt hordozó, ún. teratóma tumorok hajtásait növényre regenerálva Schilperoort korábbi hallgatója, Léon Otten, Schell kölni intézetében 1981-ben talált olyan termőképes dohánynövényeket, amelyek hordozták és mendeli módon örökítették a T-DNS oktopinszintáz génjét (Otten et al. 1981). 1982-re kiderült, hogy ezekben a növényekben az oktopinszintáz gén kivételével a T-DNS összes más génje egy deléción következtében elveszett (De Greve et al. 1982). Közben Montagu genti csoportja elkészíti az oktopin (Gielen et al. 1984) és nopalinnal Ti plazmidok T-DNS-einek teljes szekvenciáját, és ennek alapján megállapítják, hogy a növények kromoszómáiba beépülő T-DNS-szekvenciákat a Ti plazmidokban két egyirányú, 25 bp méretű ismétlődő szekvencia határolja. Ezután a T-DNS tumorképzésért felelős hormongénjeit a korábban kidolgozott eljárással pBR322 plazmiddal helyettesítik (Zambryski et al. 1983). Közben a pBR322 plazmidot megalkotó Bolivar mexikói hallgatója, a Gentben doktori dolgozatát készítő Luis R. Herrera-Estrella a nopalinszintáz gén promóter és terminációs régiói közé beépíti a *Tn5* transzpozon kanamicinrezisztencia génjét. Ezt a „kiméra” gént hordozó plazmidot a kóliból agrobaktériumba juttatva rekombinációval beépítik a T-DNS határszekvenciái közé, majd dohány levélszövetek agrobaktérium-fertőzése után kanamicinrezisztenciát mutató hajtásokat regenerálnak (Herrera-Estrella et al. 1983). Az így elkészített transzformált növények egyedül abban különböznek más dohánynövényektől, hogy stabilan hordozzák és utódjaikban szegregálják a kromoszómájukba

épített kanamicinrezisztencia-gént. Ezzel lényegében lezárul annak bizonyítása, hogy az agrobaktérium természetes úton képes a növényi sejtekbe öröklődő genetikai információt beépíteni (10. ábra). Míg ez a folyamat a természetben tumorindukcióhoz vezet, az agrobaktérium „lefejezése” a tumorindukáló gének eltávolításával lehetővé teszi T-DNS-t hordozó normális termőképes növények előállítását. A T-DNS segítségével bármely növényi vagy idegen gén beépíthető a növények kromoszómáiba, és azok funkciója, szabályozása vagy fehérjeterméke tanulmányozható pl. ismert mutációk komplementálásával növényekben. A T-DNS-transzformáció kidolgozása 1983-ban így megnyitotta az utat a növényi életfunkciók molekuláris vizsgálatához.

Az T-DNS átvitelét és kromoszomális beépülését szabályozó folyamatok megismerése

A tumorképzésre képtelen, avirulens agrobaktérium mutánsok jellemzése 1984-re kiderítette, hogy a T-DNS átvitelét növényi sejtekbe a Ti plazmidokon található virulencia (*vir*) gének A, B, C, D, F és G operonjai irányítják. A Nester-csoport és Patricia Zambrisky amerikai kutató Gentben megkezdett és később a kaliforniai Berkeley egyetemen folytatott munkái rövidesen földerítették a különböző *vir* gének funkcióit (Zambrisky 1988). Így ismertté vált, hogy a *virA* egy olyan membránreceptor, amely a sérült növényi szövetekből kiszabaduló fenolvegyületeket és cukrokat ismer föl, majd egy foszfátcsoportot juttat a *virG* transzkripció faktorra, amely ezáltal a *vir* operonok operátorszekvenciáihoz kötődve aktiválja azok transzkripcióját. Ezek közül, a *virB* operon génjei kódolják azokat a fehérjéket, amelyek fölépítik azt a szexcsatornát, amelyen a T-DNS bejut a növényi sejtekbe. A *virD1*, *D2* és *C1* fehérjék komplexe a T-DNS végein található két 25 bp méretű határszekvenciát ismeri föl, és azoknál a DNS egyik szálát elhasítja. A hasítás után az elvágott szál 5' végéhez a *virD2* fehérje kovalensen kötődik. Hasonlóan a bakteriális plazmidokat konjugáló mob pilóta fehérjékhez, a hasítási helytől induló DNS-szintézis során kiszabaduló egyszálú T-DNS-szakaszt, a T-szálat a *virD2* pilóta fehérje *virB* fehérjék pilusán át a növényi sejtekbe vezeti. Ugyanezen a piluson át több más *vir* fehérje (E2, F, D4 stb.) is bejut a növényi sejtbe, ahol ezek közül az egyszálú DNS-kötő *virE2* fehérje a *virD2* fehérjén található sejtmagi lokalizációs szignállal együtt a T-DNS-t a sejtmagba juttatja. Az agrobaktérium közvetítette génátviteli folyamatról így kiderült, hogy az a bakteriális plazmidkonjugáció egy speciális változata, amelyben a T-DNS-szegment konjugációját a T-DNS két határszekvenciája mint konjugációs origó (*oriT*) irányítja (Koncz et al. 1992).

Mivel a határszekvenciákon kívül a T-DNS nem hordoz olyan gént, amely szükséges lenne növénybe jutásához, a T-DNS-t ki lehet vágni a *vir* géneket hordozó Ti plazmidokból és átültetni kisebb plazmidokba, amelyek kóliból konjugációval vagy transzformációval bejuttathatók agrobaktériumba, és mindkét gazdában replikálódnak. Azaz, a T-DNS-mentes, virulenciagéneket hordozó segítő Ti plazmidokat tartalmazó agrobaktérium-törzsekből a T-DNS akkor is átvihető növénybe, ha annak határszek-

venciáit és az azok közé épített géneket egy másik kisebb plazmid hordozza. Ezt az elvet fölhasználva 1983–84 ben Schilperoort, Chilton, Schell és Montagu csoportjaiban elkészülnek a ma is használt modern kételemű, ún. bináris transzformációs vektorok, amelyek lehetővé teszik a növényekben tanulmányozott gének egyszerű módosítását a génmérnökség módszereivel (Hellens et al. 2000).

Az egyszerűsített T-DNS vektoroknak köszönhetően a rekombináns DNS-technológiák közvetlenül alkalmazhatóvá váltak a növénybiológiai kutatásokban. A T-DNS vektorokon a két határszekvencia között csak egy, a transzformált növények szelekciójához szükséges antibiotikum- vagy herbicidrezisztenciát biztosító génre volt szükség, amely mellé be lehet építeni bármely más növényi vagy idegen gént. Így, a korábbi nemesítési módszerekkel szemben lehetségessé vált egyetlen, jól jellemzett tulajdonságot meghatározó gén bejuttatása egy agrobaktériummal transzformálható növényfajba. Minden korábbi klasszikus nemesítési módszerrel szemben, a T-DNS-transzformációval tanulmányozhatóvá vált a növényekbe vitt ismert tulajdonságért felelős gének teljes DNS-szekvenciája és szabályozása a nemesítési eljárás megkezdése előtt. Ezért a T-DNS fölhasználásán alapuló célzott nemesítés további fejlesztésében 1984-től egyszerűen alkalmazni lehetett a molekuláris biológia egyéb területein megszerzett ismereteket is.

A genetikai mérnökség széles körű alkalmazását nagyban elősegítette az, hogy Tom Maniatis, Joseph Sambrook és Edward Fritsch, akik jelentős szerepet játszottak a transzkripció, RNS-érés, sejtosztódás, fehérjetranszport stb. szabályozó mechanizmusainak feltárásában, 1982-ben kiadják a rekombináns DNS-technikák első összefoglaló gyűjteményét, a *Molekuláris klónozás* kézikönyvét (Maniatis et al. 1982). 1983-ban megszületik egy, a molekuláris biológiai kutatásokat forradalmasító új módszer is. Kary Banks Mullis Khorana egy korábbi eljárását fölhasználja arra, hogy egy ismert DNS-templáthoz hibridizált két oligonukleotid közötti DNS-szekvenciát DNS-polimeráz segítségével megsokszorozzon (Saiki et al. 1988). Ebben a polimeráz láncreakciónak (PCR-nek) nevezett folyamatban a DNS egyik szálán az első oligonukleotiddal elindított DNS-szintézis létrehoz egy új szálát, amely a második oligonukleotid segítségével lemásolódik, és ezáltal egy, a két oligonukleotid által határolt DNS-fragment szintetizálódik. Ezt a folyamatot többször ismételve, a szintetikus DNS-fragment mennyisége 2^n -szeresre megsokszorozható, ahol n az ismétlések száma. Mivel az ismételt DNS-szintézis-ciklusok között a DNS-templát fragment két szálát el kell választani hődenaturációval, a PCR-ben a hőforrásokból izolált, közel 100 °C-on szaporodó *Thermus aquaticus* baktérium DNS-polimerázát használják, amely hőrezisztens. A PCR automatizálása nemcsak bármely DNS-fragment megsokszorozását tette lehetővé az azok végeihez kapcsolt ismert szekvenciájú oligonukleotidokkal, de fölgyorsította az oligonukleotidokkal indított és láncterminációt fölhasználó DNS-szekvenálást is. A PCR technikával lehetővé vált a DNS visszanyerése és szekvenálása minimális mennyiségű mintából, pl. akár egyetlen sejtből is. Mivel a DNS szálai közé épülő fluoreszcens festékek mennyisége arányos a DNS hosszával és mennyiségével, a PCR során megsokszorozódó DNS mennyisége is mérhető. Ezáltal pl. bármely RNS-ről készült kettős szálú cDNS elkészítésével egy mRNS sejtbeli meny-

nyisége is pontosan meghatározható. Hasonlóan, a PCR-rel izolálni és szekvenálni lehet ismert transzkripciós faktorokkal keresztkötött promóter vagy RNS-kötő fehérjékhez kapcsolt RNS-szegmenteket. Ez lehetővé tette a szabályozó fehérjék, illetve kromoszomális DNS- és mRNS-szekvenciák közötti kölcsönhatások pontos térképezését élő sejtekben, illetve azok sejtmagi DNS-ében a transzkripció, DNS-replikáció, DNS-javítás stb. különböző fázisaiban.

A növényi molekuláris biológia első lépései

Az agrobaktérium T-DNS-t fölhasználó növényi transzformációs technikák kifejlesztése után a kutatások három fő irányban folytatódtak 1984-től. A transzformációs technológiákat kidolgozó laboratóriumokban meginduló új alap kutatások célja a növényi gének izolálása, szekvenciájuk, szabályozásuk és funkcióik részletes megismerése volt. Az alapkutató intézetekkel szoros kapcsolatban számos új biotechnológiai, valamint tradicionális vetőmagtermelő és növényvédő szert gyártó cég elkezdte néhány termesztett növényfaj (pl. repce, gyapot, szója stb.) célzott nemesítését a molekuláris módszerek fölhasználásával. A cégek profiljának megfelelően a korai alkalmazások egyik célja a cégek által forgalmazott gyomirtó szerekkel (pl. glifozát/BASTA) szemben rezisztenciát biztosító gének haszonnövényekbe építése volt. Egy másik cél a nagy mennyiségben használt inszekticidek és széles gazdaspecifitású rovarirtó *Bacillus thuringiensis* (Bt) baktériumok használatának csökkentése volt meghatározott rovarfajok elleni Bt toxinok termelésével különböző növényekben. Eközben több anyagcserét irányító növényi gén megismerésével lehetővé vált egyes növényi alapanyagok, például zsírok összetételének és minőségének célzott megváltoztatása, vagy pl. a keményítő, cukrok, vitaminok és gyógyszer-alapanyagok szintézisének előnyös módosítása. Végül, az agrobaktériumokkal, rhizóbiumokkal és egyéb növényekkel együtt élő mikrobákkal foglalkozó csoportok tovább haladtak a növények, baktériumok és gombák kölcsönhatásait szabályozó mechanizmusok és gének kutatásában. Ide tartoztak a vírusok és viroidok (kis cirkuláris kórokozó RNS-ek) biológiáját és ezekkel szembeni rezisztencia kialakulását tanulmányozó csoportok is.

Az új technológiák bevezetését biztosító tudományos eredmények közérthető ismertetése azonban távolról sem követte a hatalmas iramban elindult gyakorlati alkalmazásokat. Ezért a tudományos fölfedezések ismeretének hiányában a közvéleményt az első genetikailag módosított organizmusok (GMO-k) megjelenése fölkészületlenül érte. Emiatt már az első genetikailag módosított növények laboratóriumi elkészítésével párhuzamosan megszülettek „a géneket szándékosan manipuláló” kutatókat elítélő tévhitek, amelyek alapján a biotechnológiai cégek profitéségét, terjeszkedését és a GM-növények veszélyességét gyakran militáns heveséggel kritizáló, jelentős ellenállás alakult ki. 1986-ban pl. a „Rote Zora forradalmi, feminista és génelles” csoport a növényi transzformációs technológiát kifejlesztő kölni intézetben bombát robbant. Amíg erről és sok más GMO-ellenes későbbi akcióról a közvélemény azonnal értesül, a tudományos ismeretek terjesztése és magyarázata nagy gonddal küzd

a hírek szenzációértékét sajátos mércével mérlegelő hírcsatornában (Van Montagu 2011). Így az nem számít szenzációnak, hogy a kölni intézetben Heinz Saedler kollégája, Schwarz-Sommer Zsuzsa (1946–2009; Maliga Pál és Kondorosi Ádám volt ELTE-s biológus évfolyamtársa) 1984-ben izolálja a kukorica *waxy* (keményítőszintáz) génjéből McClintock és Peterson *I* (Inhibitor) kontrolláló elemét (Schwarz-Sommer et al. 1984). Ugyanebben az évben Saedler intézetében azonosítják az első ismert növényi retro-transzpozont (a reverz-transzkriptázzal kromoszómába épülő retrovírusok közeli rokonát), valamint a kukorica *Spm/En* és az oroszlánszaj *Tam1* és *Tam3* transzpozonjait is. Ezzel egy időben, Nina Fedoroff (Carnegie Intézet, Washington) jellemezte McClintock *Ac/Ds* kontrolláló elemeit (Fedoroff et al. 1983), amellyel lehetővé vált az *Ac* és *Ds* inszerciókkal megjelölt kukorica gének azonosítása.

Fedoroff 1984-től rendszeres vendége a kölni intézetnek, amely ebben az időben az új növényi molekuláris kutatások Mekkája. Mivel a transzpozonokkal nagy gyakorisággal lehet inszerciós mutációkat indukálni eredeti gazdanövényeikben, fölmerült annak a lehetősége, hogy a kukorica és oroszlánszaj „kontrolláló elemeivel” hasonló módon mutációk készíthetők olyan növényfajokban is, amelyek nem hordoznak ismert transzpozont. Ezért Fedoroff, Schell munkatársával, Barbara Bakerrel a T-DNS-be építi a kukorica *Ac* transzpozonját, és azt dohányba (Baker et al. 1986), majd néhány évvel később *Arabidopsis*-ba transzformálják. 1987-re kimutatják, hogy dohányban az *Ac* transzpozon elhagyja a T-DNS-t, és más génekbe épül, azaz alkalmas génmutációk elkészítésére más fajokban is (Baker et al. 1987).

A kölni intézet Szeged laboratóriumában, amelyet 1984-től a fejezet szerzője irányít, gyakran találkoznak hazai és külföldi magyar kutatók, köztük Rédei és Szalay, akik 1986–87-ben tanulmányúton itt dolgoznak. A kölni Szeged labor akkori munkája vezet ahhoz a felismeréshez, hogy a T-DNS beépülése a növényi kromoszómák génjeibe a transzpozonokhoz hasonlóan génmutációkat okozhat. Ennek bizonyítására 1984-ben olyan T-DNS vektorok készülnek, amelyek egy promóter nélküli kanamicin rezisztenciagént hordoznak a T-DNS határszekvenciájához építve úgy, hogy az csak akkor aktiválódik, ha egy növényi génbe épül be a T-DNS. Ezután, Rédeivel együtt elindul az *Arabidopsis* agrobaktérium transzformációjának kidolgozása. 1989-re több ezer T-DNS-inszerciót hordozó transzformált *Arabidopsis* növényt sikerül előállítani, amelyek utódjaiban több száz levélszint, növekedést, szervfejlődést stb. megváltoztató mutáció szegregál (Koncz et al. 1989). Ezek egy részében növényi fehérjékhez fuzionált kanamicin foszfortranszferáz enzim is kimutatható, ami azt jelzi, hogy a T-DNS nagy gyakorisággal épül be növényi génekbe, azaz rendkívül hatásos mutagén.

A T-DNS-inszercióhoz kapcsolt növényi gének fragmentjeit egy, a T-DNS-be épített plazmid replikon segítségével izolálni lehet kóliban, ami megkönnyíti a mutáns gének azonosítását. 1990-re sor kerül az első T-DNS-inszercióval azonosított mutáns, a *ch42* jellemzésére, amelyben egy klorofill-bioszintézishez szükséges fehérje génjét inaktíválta a T-DNS beépülése (Koncz et al. 1990). Valamivel később, egy törpe növekedést okozó mutáció vizsgálata során sikerül azt is fölfedezni, hogy az állatokhoz hasonlóan a növényekben is léteznek növekedést irányító életfontosságú szteroid hormonok (Szekeres et al. 1996). A T-DNS mannozinszintáz génjeinek promótereit

fölhasználva, 1986-ban Szalay Aladár ötlete nyomán sikerül a *Vibrio harvey* baktérium fénykibocsátásért felelős luciferáz enzimének két alegységét egyszerre kifejezteni növényben, és így elkészül az első világító *Arabidopsis* (Koncz et al. 1987). Ezzel egy időben Stevens Howell (Cornell, Ithaca) csoportja hasonlóan kifejezteti a szentjánosbogár luciferázát kódoló cDNS-t dohányban (Ow et al. 1986). A luciferázok fénykibocsátó aktivitását mérve a növényi gének/promóterek aktivitása követhető élő növények sejtjeiben. Ugyanebben az évben Kölnbe látogat Richard Jefferson is, aki a kóli β -glükuronidáz (GUS) génjét használta föl a növényi gének/promóterek aktivitásának követésére. Egy egyszerű szövetfestési reakcióval kék színű glükuronidokat lehet kimutatni azokban a növényi sejtekben, ahol a vizsgált gének kifejeződnek (Jefferson et al. 1987). Hasonlóan a promóter nélküli kanamicin rezisztenciagénhez, röviddel később a GUS gén is alkalmazást talál a T-DNS-sel indukált GUS-fúziós fehérjéket eredményező növényi génmutációk azonosításában. Emellett folyik a világító medúzák és polipok fénykibocsátó fehérjét kódoló génjeinek felhasználása is a növényi gének aktivitásának vizsgálatában. Ezt végül az *Aequorea victoria* zöld fluoreszcens fehérjét kódoló *GFP* gén kodonjainak mesterséges megváltoztatása teszi lehetővé Roger Yonchien Tsien amerikai-kínai és Jim Haseloff angol kutató munkáinak köszönhetően (Haseloff et al. 1997).

A kétszikű növényfajok többségével szemben az egyszikű gabonafajták agrobaktérium-transzformációja jóval nehezebbnek bizonyult az 1990-es években. Ezért különböző növényi szelektálható rezisztenciagéneket hordozó plazmid DNS-ek felhasználásával megindult a növényi sejtek és protoplasztok DNS-transzformációs módszereinek kidolgozása is. A bázei Friedrich Miescher intézetben Ingo Potrykus-szal és Barbara Hohn-nal dolgozó lengyel biológus, Jerzy Paszkowski számol be először dohány protoplasztok sikeres DNS-transzformációjáról 1984-ben (Paszkowski et al. 1984). Dudits Dénes és kiváló szegedi kukoricanevelő munkatársa, Mórocz Sándor ugyancsak a DNS-transzformáció módszerét használják föl, hogy embriogén protoplasztokból herbicidrezisztens, természetű kukorica vonalakat izoláljanak (Omirulleh et al. 1995). Paszkowski 1988-ban fölfedezi, hogy egy antibiotikum rezisztenciagén két fragmentje között homológ rekombináció történhet növényi sejtekben (Paszkowski et al. 1988). Ennek ellenére, a növényi génmódosítási eljárások lényeges problémája marad az, hogy szemben az élesztő- és állati sejtekkel, a T-DNS-en vagy plazmid DNS-eken bevitt gének és a kromoszómák génjei között a növényi testi sejtekben az ún. szomatikus rekombináció gyakorisága nagyon alacsony. Ezért a kromoszómális gének egyszerű módosítása (pl. egy pontmutáció célzott beépítése egy génbe) agrobaktérium- vagy DNS-transzformációval nehezen végrehajtható.

1987-ben John C. Sanford növénygenetikus és munkatársai a Cornell Egyetemen elkészíteneek egy nagy nyomású sűrített levegővel működő „génpuskát”, amellyel mikroszkopikus méretű hordozókra (pl. arany golyócskákra) kötött DNS-t lehet belőni növényi sejtekbe, és ezzel a módszerrel DNS-t beépíteni a sejtek kromoszómáiba (Klein et al. 1987). 1990-ben Maliga Pál és felesége, Sváb Zóra (Waksmann Intézet, Philadelphia) a kloroplasztisz 16S RNS gén sztreptomycin rezisztenciát szolgáltató mutáns verzióját a génpuska segítségével dohány kloroplasztiszokba transzformálják

(Svab et al. 1990). Ezzel lehetővé válik a kloroplasztisz DNS-en kódolt gének célzott módosítása, illetve idegen gének kifejeztetése ebben a sejtorganelumban is.

A korábban hasonlóan kloroplasztisz mutánsokkal és fehérjékkel foglalkozó Nam-Hai Chua (Rockefeller Egyetem, New York) laboratóriumában megkezdődik a kloroplasztisz fehérjéket kódoló és fény szabályozott sejtmagi gének promóter régióinak vizsgálata, valamint a karfiol mozaik DNS vírus promótereinek jellemzése és fölhasználása idegen gének kifejeztetésére növényekben (Benfey és Chua 1989). Ugyancsak Chua csoportja megkezdte a különböző promóter szekvenciákhoz kötődő transzkripciós faktorok azonosítását, a transzkripciót szabályozó DNS-szekvenciák (ún. cisz-regulátor elemek) szisztematikus tanulmányozását (Katagiri és Chua 1992). Chua intézetében Steve Key és Maliga volt szegedi hallgatója, Nagy Ferenc vezetésével 1986-tól elindul a növényi fényreceptorok génjeinek és szabályozó funkcióinak vizsgálata is (Nagy et al. 1986). Az utóbbi kutatások eredményeként, Key és Nagy fölfedezik a transzkripciós aktivitás napi ciklusos változását (ún. cirkádian ritmust) szabályozó belső biológiai óra első elemeit növényekben (Millar et al. 1992). 1990-re a növényi molekuláris biológiai kutatásokon dolgozó laboratóriumok száma meghaladja a százat, amelyek itt föl nem sorolható eredményei kezdenek komoly betekintést nyújtani a legfontosabb növényi életfunkciókat irányító gének szerkezetébe és szabályozásába.

Arabidopsis: a molekuláris biológia modellnövénye

1987-ben kétszáz kutató 85 előadással jelenik meg a tizenegy év után újra megszervezett 3. *Arabidopsis*-konferencián az amerikai Michigan állam east-lancing-i egyetemén. A szervező Chris Somerville-t még 1976-ban Rédei segítette etil-metán szulfonáttal végzett *Arabidopsis* mutagenézis kísérleteiben, amelyek röviddel később számos, addig ismeretlen anyagcserehibát okozó érdekes mutáció jellemzéséhez vezettek (Somerville 2001). A konferencia résztvevői között találjuk a wageningeni Maarten Koornneef-et, aki 1983-ra elkészítette az *Arabidopsis* kromoszómák nagy fölbontású genetikai térképét (Koornneef et al. 1983). Egy másik előadó a fiatal *Drosophila*-genetikus Elliot Meyerowitz, aki 1986-ra DNS-hibridizációs vizsgálatokkal jellemezte az *Arabidopsis* sejtmagi kromoszomális DNS ismétlődő és egyedi szekvenciáit, és ennek alapján megbecsülte az *Arabidopsis*ban található gének számát. 1985-ben Meyerowitz volt az első, aki Rédei összefoglaló cikkeit elolvasva, a Science folyóirat hasábjain újra fölhívta a tudományos közvélemény figyelmét az *Arabidopsis*szal végzett genetikai kutatások páratlan előnyeire (Meyerowitz és Pruitt 1985). A konferencia egyik fő témája a T-DNS-inszerciós mutagenézis, amely a génfunkciók kiütése és azonosítása mellett biztosítja a mutáns gének azonnali izolálását is. A bevezető nagy előadást Alan M. Lloyd, a növényi molekuláris biotechnológia éllovasának tartott Monsanto cég kutatója tartja, aki kb. száz szövettenyészetben T-DNS-sel transzformált *Arabidopsis*-vonal előállítását ismerteti (Lloyd et al. 1986). A „kinek van több transzformánsa” kérdésre a genti Dirk Valvekens (Valvekens et al. 1988) 800-as licitje után a fejezet szerzője a

„legalább 3000” választ adja. A konferencia itt rövid időre megszakad, és a licitelőket fölkéri arra, hogy röviden ismertessék *Arabidopsis*-transzformációs eljárásaikat. A szövettényészési módszerek mellett Kenneth Feldmann a wilmingtoni DuPont cégtől beszámol arról, hogy agrobaktérium-szuszpenzióban csírázó *Arabidopsis* magokból is lehet jelentős számú T-DNS-sel transzformált növényt nyerni (Feldmann és Marks 1987). Az előadások elhangzása után világhosszá válik, hogy a legrosszabb becslések alapján is már közel 10 000 T-DNS inszerció áll a kutatás rendelkezésére az *Arabidopsis* genomban, amely legalább egy nagyságrenddel több, mint bármely más növényben ismert mutációk száma. Ez egy döntő érv arra, hogy az amerikai Nemzeti Tudományos Alapítvány (NSF) programbizottsága meggyőződjön arról, hogy az *Arabidopsis* az első olyan növény, amelynek összes génjét és kromoszómáinak teljes szekvenciáját a lehető leggyorsabban meg lehet ismerni.

Az ezt követő 4. *Arabidopsis*-konferencián Bloomingtonban 1989-ben megalakul egy nemzetközi szervezőbizottság, amelynek tagjai között megtalálhatjuk a nagynevű élesztőgenetikus Jerry Finket, a humán inzulin gént izoláló Howard Goodman-t és számos vezető európai és japán kutatót. Az USA, több nyugat-európai ország és Japán tudománytámogató szervezeteinek addig példátlan összefogásával 1990-ben elindul a nemzetközi *Arabidopsis* genom projekt, amelynek célja más modellorganizmusokhoz hasonlóan a növényi modell *Arabidopsis* teljes DNS-szekvenciájának megismerése. Az új molekuláris genetikai eljárások ismertetése és oktatása céljából 1992-ben Koncz, Chua és Schell kiadják az első *Arabidopsis* módszertani kézikönyvet, és egy *Arabidopsis* tanfolyamot szerveznek Kölnben (Koncz et al. 1992), amelyet egy hasonló kurzus követ Watson Cold Spring Harbor-i intézetében. 1994-ben Meyerowitz és Somerville gondozásában megjelenik az *Arabidopsis* enciklopédia (Meyerowitz és Somerville 1994), amely több száz virágfejlődést, virágzási időt, hormonális szabályozást, stresszválaszt, fotoszintézist és más anyagcsere-folyamatot szabályozó gén, illetve szignálátviteli út fehérjéinek jellemzését ismerteti. Rövid négy év után az *Arabidopsis* életfolyamatainak megismerése molekuláris szinten fej-fej mellett halad a hasonló kutatásokkal élesztőben és *Drosophilában*.

Az *Arabidopsis*szal dolgozó laboratóriumok száma az 1990-es években közel tízezerre nő. A nemzetközileg egyeztetett kutatási terveknek megfelelően, az amerikai, európai és japán csoportok fölöstják egymás között az *Arabidopsis* öt kromoszómájának szekvenálását. A robbanásszerűen növekvő molekuláris információ rendszerezésére létrehozzák az *Arabidopsis* Információs Központot (TAIR-t) és a mutáns magokat és DNS-konstrukciókat fönntartó és terjesztő ohioi és nottinghami törzsgyűjteményeket. Az *Arabidopsis*-kromoszómák egymással átfedő szegmentjeit mesterséges élesztő és bakteriális kromoszóma vektorokba építik, majd a szegmentek végeiről készített hibridizációs próbák segítségével megállapítják azok sorrendjét a kromoszómákon. Ezt a munkát nagyban segíti, hogy több száz gén és több ezer T-DNS-inszerció helyzete már ismert a kromoszómákon. 1993-ben Georges Pelletier versailles-i csoportja fölfedezi, hogy az agrobaktériumok fejlődő virágokba juttatásával a petesejt, illetve embrió sejtjei nagy gyakorisággal transzformálhatók, amivel tetszőleges számú *Arabidopsis*-transzformáns előállítható. Ezzel a módszerrel az *Arabidopsis*

genom „telíthető” T-DNS-inszerciókkal úgy, hogy minden génben található legyen legalább egy T-DNS-sel indukált mutáció (Bechtold et al. 1993).

1995-ben Craig Venter csoportja (Inst. Genome Research, Baltimore) elkészíti az első ismert restriktions endonukleázokat produkáló *Haemophilus influenzae* baktérium kromoszómájának szekvenciáját, amely 1740 gént kódol. Ezt követi 1996-ban az élesztő 6000 gént hordozó genomjának, majd 1998-ban a fonálféreg (*Caenorhabditis elegans*) közel 1 millió bázispár (97 Mb) méretű és kb. 20 400 fehérjét kódoló sejtmagi genomjának szekvenálása. Az *Arabidopsis* genomszekvenáló nemzetközi konzorcium 2000-ben ér célba, és ezzel kiderül, hogy a növényi modell kromoszómáiban található DNS mérete kb. 134,6 Mb, amely 27 416 fehérjét kódoló gént, 4827 transzpozont, illetve mutáns gént, valamint 1359 egyéb, más szabályozó RNS szintéziséért felelős gént hordoz (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

A 21. századi növénybiológia, nemesítés és a bioinformatikai információrobbanás

A növényi életfolyamatok molekuláris megértését célzó kutatások 21. századi történetéből a korábbi évtizedekhez hasonlóan is csak néhány példát említhetünk meg e fejezet keretein belül. Az elmúlt két évtized nagy fölfedezései közül talán a legjelentősebb annak felismerése volt, hogy a gének aktivitását az RNS-polimerázokkal kölcsönható általános és szekvenciaspecifikus transzkripció faktorok mellett számos kis- vagy nagyobb méretű fehérjét nem kódoló RNS-molekula is szabályozza. Sidney Altman és Thomas Cech amerikai molekuláris biológusok már 1989-ben átvehették Nobel-díjukat az enzimekhez hasonló katalitikus aktivitással rendelkező RNS-molekulák fölfedezéséért, amelyek első példáit a fehérjék segítségével nélkülönkivágódásra képes *Terahymena* intronok szolgáltatták (Cech 1990). A katalitikus aktivitással rendelkező RNS-ek, ribozimek további kutatása lehetővé tette RNS- vagy fehérjeszekvenciákat fölismerő és módosító katalitikus RNS-ek tervezését, amelyek akár autonóm replikációs tulajdonsággal is elláthatók. Az mRNS-ek vagy fehérjék ribozimekkel történő inaktiválása lehetőséget nyújt egyes tulajdonságok (pl. betegséget okozó faktorok) célzott kiiktatására. A ribozimekkel kapcsolatosan itt meg kell jegyeznünk, hogy az első „kalapácsfejű” ribozimet már 1986-ban leírták növényi RNS-vírusokban és viroidokban, és hogy számos ribozimet kódoló gént ezt követően 2005-ben azonosítottak *Arabidopsis*-ban is (Prody et al. 1986; Przybilski et al. 2005).

1993-ban Victor Ambros, Rosalind Lee és Rhonda Feinbaum fölfedezték, hogy a fonálféreg *Lin14* génjéről szintetizálódó fehérje mennyiségét egy másik, a *lin4* génről származó 21 bp méretű mikro-RNS szabályozza a *Lin14* mRNS riboszomális transzlációjának gátlásával (Lee et al. 1993). 1994-ben a szerző volt kölni hallgatója, Michael Wassenegger Heinz Sängert müncheni laboratóriumában fölfedezte, hogy a T-DNS-sel dohányba transzformált burgonya PSTVd viroidról egy kis RNS szintetizálódik, amely a T-DNS-en található viroid gént kikapcsolja, illetve lecsönnesíti azt a DNS-szekvenciában található GC párok citozin metilációjával (Wassenegger et al.

1994). 1999-ben Andrew Hamilton és David Baulcomb a norwichi John Innes Intézetben bizonyítják (Hamilton és Baulcombe 1999), hogy egyes gazdagének kikapcsolását is olyan kis RNS-ek okozzák, amelyek szabályozzák azok citozin metilációját. Az ezredforduló első éveiben több csoport egy időben fölfedezi, hogy a növényekben is megtalálható mikro-RNS-ek az mRNS-ek translációjának gátlása mellett képesek az mRNS-ekkel bázispárosodva indukálni azok szekvenciaspecifikus elhasítását a mikro-RNS-eket szállító Argonaut fehérjék közvetítésével (Voinnet 2009). A kis csön-desítő si-RNS-ek és mikro-RNS-ek érési és hatásmechanizmusainak részletes megértése elvezetett számos olyan technológia kidolgozásához, amellyel pl. vírusokkal vagy mikro-, illetve si-RNS-t kódoló gének szabályozott kifejeztetésével egy vagy több gazdagén aktivitása célzottan kikapcsolható növényekben. Így pl. ma már tervezhető olyan mesterséges mikro-RNS-ek is, amelyekkel bármely tetszőleges mRNS inaktiválható, azaz az azt kódoló gén aktivitása gátolható. Ugyanakkor ismert, hogy a növényi, állati és humán mikro-RNS-ek fontos szerepet játszanak a sejtsztódás, differenciálódás, stresszválaszok és sok más folyamat szabályozásában. A folyamatok hibáit, amelyek pl. tumorképződéshez vezetnek egy mikro-RNS helytelen túltermelése miatt, ma már ki lehet javítani a mikro-RNS-ekkel bázispárosodó mesterséges kis RNS-ek vagy oligonukleotidok segítségével (Ossowski et al. 2008).

Az utóbbi évek egyik legprecízebb technológiája a gének módosítására azt az alapvetet használja föl, hogy a sejtekbe juttat egy olyan RNS-t, amellyel a gének szekvenciáiban specifikus mutációk, akár bázispárcserék is elkészíthetők. A célgén szekvenciáival bázispárosodó komplementer RNS-t egy olyan rövid kettős szálú RNS-régióhoz kapcsolják, amelyet fölismer egy bakteriális endonukleáz, a Cas9. A célgén DNS-ével bázispárosodó „vezető” RNS segítségével a Cas9 endonukleáz elvágja a célgén DNS-ét, amelyben a vágott hely kijavításának gyakori hibái miatt mutációk keletkeznek. A Cas9 fehérje endonukleáz aktivitását kiiktatva, a specifikus génszekvenciákkal párosodó RNS-fehérje komplex gátolja a célgén átíródását. Hasonló módon, a Cas9 fehérje fuzionálható más transzkripciót aktiváló fehérjékkel, és ezáltal egy gén kívánt módon be is kapcsolható (Mali et al. 2013).

Az összes eddig említett génmódosító eljárásához feltétel volt idegen DNS bevitelle a módosítandó gént hordozó organizmus sejtjeibe. Ezt nem teszi szükségessé azonban az az új módszer, amely Ulla Bonas hallei csoportjának munkájából született meg 2009-ben. Bonas, aki az oroszországi *Tam1* transzpozonját azonosította 1984-ben Kölnben, később az egy- és kétszikű növényeken szaporodó *Xanthomonas* baktériumfajok betegséget okozó génjeinek vizsgálatával foglalkozott. Munkája során fölfedezte, hogy a *Xanthomonas* fajok, az agrobaktériumhoz hasonlóan számos olyan, ún. effektor fehérjét juttatnak pilusaikon keresztül a gazdanövények sejtjeibe, amelyek a sejtek védekezőképességét lecsökkentik. Az ilyen effektorok egyike az AvrBs3/PthA fehérje, amelyről kiderült, hogy a gazdanövény sejtmagjába behatol, és ott a gazda immunitásért felelős génjeinek kifejeződését szabályozza (Boch és Bonas 2010).

Az AvrBs3 fehérje vizsgálata kiderítette, hogy az egy transzkripciót aktiváló TALE faktor, amely egy ismétlődő peptid egységekből fölépülő DNS-kötő régiót (domént) hordoz, és a gazdagének promóter régióiban rövid DNS-szekvenciákat ismer

föl. A TALE faktor DNS-kötő tulajdonságainak vizsgálata kimutatta, hogy az azon belül ismétlődő peptidek egy-egy specifikus bázis fölismeréséért felelősek a fehérjét kötő DNS-szekvenciákban (Boch et al. 2009). A DNS bázissorrendjét fölismerő peptidkód megismerése lehetővé tette a peptidek sorrendjének megváltoztatásával olyan új TALE faktorok létrehozását, amelyek képesek egy kívánt DNS-szekvenciához kötődni bármely génben. A korábban említett Cas9 rendszerhez hasonlóan, a TALE faktorok DNS-kötő peptidjeivel fuzionálni lehet pl. a Fok1 endonukleázt. Az így elkészített TALEN fehérjékkel a kiválasztott célgén DNS-e a kívánt szekvenciáknál elhasítható. Ennek segítségével az elhasított gén szekvenciájában bázispár-deléciók vagy -cserék, pontmutációk izolálhatók. Az elmúlt két évben a TALEN faktorok hódító útjukra indultak a biológia és orvostudomány minden területén. Segítségükkel idegen DNS-szekvenciák fölhasználása nélkül módosítható tetszés szerint kiválasztott gének aktivitása, mint például olyanoké, amelyek meghatározzák a növények és állatok kórokozókkal szembeni érzékenységét, vagy szerepet játszanak a tumorsejtek kontrollálatlan osztódásában (Bedell et al. 2012).

Mióta Craig Venter és munkatársai 2001-ben közzölték az első humán genomszekvenciát (Venter et al. 2001), a DNS-szekvenálási és bioinformatikai technológiák elkövető fejlődésének lehettünk szemtanúi. Az új generációs DNS-szekvenálási módszerekkel ma, a korábban 10 évet igénylő *Arabidopsis* genomszekvencia elkészítése egy vagy alig több napot igényel. Egy lépésben több száz különböző *Arabidopsis* természetes variáns vagy mutáns teljes szekvenciája elkészíthető és analizálható (Cao et al. 2011). Korábban a vegyszerekkel vagy sugárzással indukált mutációk térképezése és egy mutáns gén azonosítása több évi megfeszített munkát igényelt. Ma már elegendő a mutáns vad típussal való visszakeresztése után a hibridek utódgenerációiban szegregáló mutánsokat begyűjteni és DNS-ük keverékét megszekvenálni ahhoz, hogy egy bázispárcserét okozó pontmutáció helyzetét az *Arabidopsis* genomban pontosan meghatározzuk. Korbinian Schneeberger kölni bioinformatikus „k-mer” mintafelismerő programjai azt is lehetővé teszik, hogy ismert genomszekvencia hiányában is azonosítani tudjunk egy ismeretlen génmutációt bármely növényben (Nordström et al. 2013). 2013-ban az év módszerének az egysejt szekvenálást választották, amivel egyetlen humán sejtéből a kromoszomális DNS és a sejt teljes RNS-készletének szekvenciája egyszerre elkészíthető és az mRNS-ek előfordulási gyakorisága is meghatározható (Eberwine et al. 2014).

Az utóbbi évek technikai fejlődésének köszönhetően, az *Arabidopsis*, rizs, szója, fekete nyár, kukorica, szőlő és lucerna rokon *Medicago truncatula* után 2013-ban rendelkezésünkre állt már a burgonya, paradicsom, petúnia, dohány, kasszava, papaya, banán, datolyapálma, kenyérbúza és még számos növényfaj, összesen 252 genom teljes vagy részleges szekvenciája. 2014-re várható, hogy ez a szám exponenciálisan növekszik, és a következő évtized végére feltehetően megismerjük a botanikus kertek, erdők, mezők, dzsungelék és vizek ezernyi vagy tízezernyi növényfajának szekvenciáját. Ez után valószínű, hogy növényrendszertani ismereteinket gondos revízió alá kell vennünk, mert a fajok között eddig morfológiai és szaporodási jellegeik alapján meghatározott határokat a megismert DNS-szekvenciák összehasonlítása jelentő-

sen módosíthatja. Például, az *Arabidopsis* közele rokonától, a borzas kakukktormától (*Cardamine hirsuta*) rendszertanilag főleg az különbözteti meg, hogy a kakukktorma levele összetett és szabdalt, míg a lúdfű egy levélnyélen csak egy lándzsa alakú levéllemezt fejleszt. E megkülönböztető rendszertani jegyért azonban egyetlen gén a felelős, ami a kakukktormában és az összes káposztafélében jelen van, de elveszett a lúdfűből (Vlad et al. 2014).

Az már biztos, hogy a 21. század nemesítőjének hamarosan nem kell attól félnie, hogy nem tudja, milyen génekkel és DNS-szekvenciákkal készíti el hibrid növényeit. Az azonban valószínűleg még eltart egy ideig, hogy pontosan megismerje minden gén funkcióját, szabályozásuk hálózatait, az azokban részt vevő RNS-ek és fehérjék kölcsönhatásait, valamint a sejtműködést, osztódást, differenciálódást, szervfejlődést stb. szabályozó folyamatok teljes molekuláris hátterét. Az ezeken a területeken az elmúlt két évtizedben elért hatalmas fejlődést lehetetlen egy fejezet vagy akár egy könyv keretein belül áttekinteni. Illusztrációként ezért csak azt jegyezzük meg, hogy 2013-ban kb. 10-12 000 *Arabidopsis* gén funkciójáról rendelkezünk valamilyen ismerettel, és ezek 5%-áról állt rendelkezésünkre a funkciót kísérletesen bizonyító részletes adat. Ugyanakkor az *Arabidopsis* gének által kódolt RNS-ek mennyiségének változásáról kb. 28 000 kísérlet számolt be különböző körülmények között és kb. 17 000 adat-együttes szolgáltatott segítséget a fehérjék közötti kölcsönhatások megismeréséhez. Ezzel a növénybiológia is belépett az ún. „omikák” (transzkriptomika, proteomika, metabolomika, degradomika stb.) korszakába, ahol az *Arabidopsis*-génekészlethez kapcsolódó több ezermilliárd adat közötti tájékozódás lehetetlen a hálózati adatokat rendszer-biológia szintjén földolgozó professzionális bioinformatikai háttér nélkül. Ez azonban már a jelenlegi fejlődés szintjén is lehetővé teszi, hogy egy génmutáció, megváltoztatott génfunkció vagy egy idegen gén beépítése által okozott változásokat a transzkripció, transláció, anyagcsere, hormonhatások és fejlődés szabályozásának szintjén nagy pontossággal követhessük (Rhee és Mutwil 2013).

Epilógus, avagy féljünk-e a GMO-któl

Hazánk új alaptörvényének XX. cikkelye kimondja, hogy: „1: Mindenkinek joga van a testi és lelki egészséghez”, valamint „2: Az (1) bekezdés szerinti jog érvényesülését *Magyarország genetikailag módosított élőlényektől mentes mezőgazdasággal*, az egészséges élelmiszerekhez és az ivóvízhez való hozzáférés biztosításával (...), valamint a környezet védelmének biztosításával segíti elő.” Ezért történeti visszapillantásunk végén vizsgáljuk meg, hogy az eddigi tudományos ismereteink alapján mit is takar a „genetikailag módosított élőlények” fogalma.

Amint láttuk, a legegyszerűbb egysejtű baktériumok körében a „genetikai módosítás” egy gyakori és természetes esemény, amelynek során az egyik baktérium „előre megfontolt szándékkal” átjuttat egy másikba egy plazmidot, episzómát, fágot, de akár kromoszomális DNS-ének teljes egészét vagy annak részleteit, és ezzel megváltoztatja és módosítja a fogadó baktérium génekészletét és tulajdonságait. Ennek veszélyes

következménye például, hogy kórházainkban egyre terjednek a sokszoros antibiotikum-rezisztenciával rendelkező kórokozók, amelyek elleni védekezés egyre reménytelenebb, mert a tudomány által megismert antibiotikumok teljes skálája elleni rezisztencia már megtalálható a mikrobákban. Ebben a fejezetben megtudtuk, hogy az agrobaktériumok nemcsak más baktériumokkal tudnak genetikai információt kicserélni, de képesek a magasabb rendű növények sejtjeibe is DNS-t beépíteni, amely a sejtek osztódásához és tumorok kifejlődéséhez vezet. Megismertük, hogy a növényi tumorok létrejöttéért a tumorindukáló Ti plazmidok egy régióján, a T-DNS-en kódolt gének a felelősek, amelyek a baktériumok szexpilusain át jutnak a növényi sejtekbe, ahol beépülnek a növények kromoszómájába, és felismerődnek a gazda transzkripció rendszerére által. A T-DNS-t növényi sejtbe juttató virulencia (vir) gének funkcióját ismertetve megemlégtünk, hogy a plazmid DNS-ek baktériumok közötti átviteléért, mobilizációjáért felelős *mob* fehérje funkciója nagyon hasonló a T-DNS-t növényi sejtbe vezető virD2 pilóta fehérje funkciójához. Valóban, a T-DNS-t növényekbe juttató IV-es típusú szekréciós szexcsatornákon (T4SS) nemcsak a T-DNS, de más bakteriális plazmidok DNS-e is bejuthat növényi sejtekbe! Például már 1987-ben ismert volt, hogy egy RSF1010-nek nevezett plazmid a saját maga által kódolt *mob* fehérje segítségével a T-DNS szexcsatornáját felhasználva átkonjugál agrobaktériumból növényi sejtbe, és mi több, beépül a T-DNS-hez hasonlóan a növények kromoszómáiba (Buchanan-Wollaston et al. 1987; Bravo-Angel et al. 1999). 2005-ben a növénybiológia „fenegyereke”, Richard Jefferson csoportja kimutatta, hogy a kételemű Ti plazmid transzformációs vektorok T-DNS-ei a szimbiotikus nitrogén fixálásáért felelős *Rhizobium* törzsekből is bejutnak egy- és kétszikű növényekbe, és integrálódnak azok sejt-magi kromoszómáiba (Broothaerts et al. 2005). 1995-től megtudtuk azt is, hogy az agrobaktérium képes bejuttatni a T-DNS-ét élesztőkbe (Bundock et al. 1995), fonalas gombákba (Jiang et al. 2013), tengeri uborkákba (Bulgakov et al. 2006), valamint állati és humán sejtekbe (bár az utóbbiak transzformációjához ki kell játszani az agrobaktérium DNS-átviteli rendszer hőérzékenységét) (Citovsky et al. 2007). Amint azt említettük, a T-DNS eredeti génjeit fölismerő növényi RNS-polimeráz II és a gomba-, valamint emlőssejtek RNS-polimerázai, illetve intront kivágó spliceozómái közötti különbségek miatt, a T-DNS kódolta gének nem működnek helyesen gomba- és állati sejtekben. A T-DNS azonban hasznos vektorként szolgál pl. számtalan gomba biotechnológiai módosításában, és lehetővé teszi az *Arabidopsis*-ra kidolgozott génkiütési eljárások alkalmazását, mert a T-DNS kromoszomális beépülése a növényekhez hasonlóan a gombák sejtjeiben is mutációkat okozhat.

A baktériumgenetikai vizsgálatok további előrehaladása az elmúlt évtizedben azt is kimutatta, hogy számos más baktérium is hordoz olyan géneket, amelyek az agrobaktérium szexcsatorna fehérjéit kódoló *virB* génekhez, illetve a T-DNS-t növénybe szállító *virD2* fehérje génjéhez hasonlóak. Christoph Dehio, aki Jeff Schell hallgatójaként a *Shinorhizobium*-ból növényekbe történő génátvitel lehetőségét vizsgálta Kölnben, a párizsi Pasteur Intézetben egy évtizeden át tanulmányozta azokat a baktériumtörzseket, amelyek agrobaktériumhoz hasonló virulencia géneket hordoznak. Dehio 2011-ben fölfedezte, hogy az emberben súlyos betegségeket (pl. fehér-

vérség) okozó *Bartonella* törzsek képesek az agrobaktériumhoz hasonló T4SS szexcsatornáikon keresztül egy plazmidjukat humán sejtekbe konjugálni és azt beépíteni humán kromoszómákba. Röviddel ezek után kimutatta, hogy a széles gazdaspecificitású R388 plazmid ugyanezen a T4SS csatornán jut át Bartonellából más baktériumokba és humán sejtekbe is, ahol integrálódik a kromoszómákba (Llosa et al. 2012). Ez a megdöbbentő észlelés arra a valós lehetőségre hívta föl a figyelmet, hogy az emberben élősködő vagy szimbiotikus baktériumok természetes módon genetikai információt juttathatnak az emberi sejtekbe. Logikus azt feltételezni, hogy a humán kromoszómákba épülő bakteriális DNS elronthat, mutáltathat életfontosságú géneket, mint pl. egy tumor szuppresszor gént, amely az anyai vagy apai gén hibája miatt csak egy működő kópiában van jelen sok emberben. A 2012-ben indult Humán Mikrobiom Projekt (HMP) az új generációs szekvenálási módszerekkel a bőrön, vérben, nyálkahártyákon, bélben és egyéb szervekben több mint 50 különböző baktériumnemzetség fajait mutatta ki. A vizsgálatok az emberi szervezetben megtalálható 10^{14} baktérium között túlszaporodó fajok és a gyakori betegségek között (pl. szív-érelmeszesedés, beteges kövérség, colitis, asztma, psoriasis, idegfejlődési és pszichológiai zavarok, korai öregedés stb.) világos ok-okozati összefüggéseket állapítottak meg rövid egy év alatt (Cho és Blaser 2012; Heintz és Mair 2014). A gyomor baktériumflórájában a *Helicobacter pylori* a legelterjedtebb, az emberek több mint 50%-ában megtalálható. Barry Marshall és John Robin Warren ausztrál orvosok önmagukon végzett kísérletekkel 1983–89-ben igazolták, hogy a *Helicobacter* a gyomorfekély és gyomorrák kórokozója. A T4SS szexcsatornák közvetítette DNS-átvitel folyamatának konzerváltsága miatt ezért megdöbbentő az az alig egy hónapja megjelent közlemény, amely kimutatja, hogy a T4SS pilus nemcsak egy rákkeltő CagA fehérjét, de DNS-t is képes a sejtek között átjuttatni (Fernandez-Gonzalez és Backert 2014).

Mindeddig az állati és emberi DNS-ek szekvenálása során a bioinformatikai szűrőprogramokkal eltávolítottak az adatok közül minden olyan bakteriális szekvenciát, ami arra utalt, hogy a forrásként használt szövetminták esetleg baktériummal szennyezettek voltak, vagy bakteriális szennyezés lehetett jelen a szekvenálást megelőző PCR reakciókban. A tavalyi év módszerének választott egysejt szekvenálással azonban lehetségessé vált annak közvetlen bizonyítása, hogy baktérium plazmid vagy esetleges kromoszomális DNS-szakaszok beépülnek-e életünk folyamán sejtjeinkbe. Talán hamarosan kiderül, hogy mindannyiunk számos sejtje állandó genetikai módosításnak van kitéve, azaz mi, akik esetleg meggyőződve elítéljük a GMO-kat, saját magunk is legalább részleges GMO-k vagyunk. Hogy ennek vannak-e esetleg hasznos vonatkozásai is, az majd csak később derül ki. Már most ismert azonban, hogy egyes bennünk élősködő baktériumok anyagcseretermékei agyunk működését, idegsejtjeink differenciálódását és immunreakcióinkat pozitív vagy negatív módon befolyásolják (An et al. 2014; De Vadder et al. 2014).

Most pedig vizsgáljuk meg, mit is manipuláltak össze a növényekben azok a fejzetben is emlegetett „elvetemedett” kutatók, akik miatt hazánkban az alaptörvény újabb megváltoztatásáig tilos GMO-kat fölhasználni a mezőgazdaságban. Amint azt

elmagyaráztuk, az agrobaktérium transzfer DNS-én nincs egyetlen gén sem, amely szükséges lenne ahhoz, hogy növényi sejtbe kerüljön és ott a kromoszómába integrálódjon. Mindehhez csak két 25 bp hosszúságú DNS-szakaszra van szükség, amely közé bármilyen gént, növényit vagy más organizmusból származót, be lehet építeni. A kutatások kezdetén e két T-DNS-határszekvencia közé építettek be egy olyan gént, amely segített a T-DNS-sel transzformált növények szelektálásában antibiotikum- (pl. kanamicin-) rezisztenciájuk alapján. A szelektálható gén mellé helyezték el azokat a géneket, amelyeknek a funkcióját, szabályozását vagy fehérjetermékét meg akarták vizsgálni növényekben. Valamivel később az is lehetségessé vált, hogy a szelektálható gént kicseréljék egy fénykibocsátó fehérjét (pl. GFP-t) kódoló génre, amelynek aktiválása pl. a növények magjaiban látható volt, és így a T-DNS-t hordozó transzformáns növényeket antibiotikum nélkül is azonosítani lehetett.

Mint minden tudományágban, a technikai fejlődéssel az alkalmazások is tökéletesedtek. A T-DNS-en gyakorlati alkalmazás céljából növénybe vitt gének mellől az új technológiák alkalmazásával el lehetett távolítani a szelektálható antibiotikum-rezisztenciáért vagy fénykibocsátásért felelős gént. Ez úgy történt, hogy a szelektálható gén két oldalára egy olyan endonukleáz hasítóhelyeit építették be, amely semmilyen szekvenciát nem ismert föl a növények kromoszomális DNS-ében. Így, ha ezt az endonukleázt (pl. I-SceI, Cre stb.) kifejeztették növényben, akkor a T-DNS-ből a szelektálható idegen gén pontosan kivágódott, és csak az alkalmazás céljából módosított gén maradt meg egy kópiában a kromoszómába építve (Tuteja et al. 2012). Ennek az ún. „markermentes” eljárásnak a következő lépésében az endonukleáz génjét eltávolították a módosított gént hordozó T-DNS mellől egy keresztezéssel, amellyel egyben a módosított gén át is került a kívánt termesztett növényfajtaiba.

Mivel a kritikák kizárták azt, hogy bármely idegen, nem növényi gén kerüljön be növényekbe, a harmadik generációs génmódosítási eljárásokban már csak ismert funkciójú növényi eredetű gén kerül beépítésre a T-DNS két határszekvenciája közé. A nagy gyakoriságú transzformációs módszerek kidolgozásának köszönhetően, ma már az is lehetséges, hogy a T-DNS-t hordozó növényeket PCR technikával azonosítsák. Helyes tervezéssel, a növényi gént közrefogó T-DNS-határszekvenciákból az egyik oldalon 1 vagy 3 nukleotid, a másik oldalon pedig gyakran egy sem marad a T-DNS beépülése után a genetikailag módosított növény kromoszómájában. A jelenleg hozzáférhető módszerekkel így egy (vagy több) kívánt tulajdonságot kódoló gént be lehet építeni idegen gén segítsége nélkül is egy növény kromoszómájába. Mivel így egy növény génmutációja ugyanannak a fajnak egy vad típusú génjével (alléljével) komplementálható (kijavítható), az idegen gének átvitelét eredményező transzgenikus technológiával szemben ezt a módszert ciszgénis eljárásként emlegetik.

A növényi gének átvitele egyik fajtából a másikba a ma rendelkezésünkre álló T-DNS transzformációs módszerekkel gyakorlatilag semmiben nem különbözik a klasszikus nemesítési eljárásoktól. Csak annyiban, hogy nem nagy és jórészt ismeretlen kromoszómaszakaszt épít át egyik fajtából vagy fajtából a másikba, hanem kizárólag csak azt a gént, amely a kívánt tulajdonságért felelős. Mindehhez nem szükséges 10–15 év keresztezési munka. Az eredmény 2-3 éven belül látható, mérhető, és szükség sze-

rint a létező nemesítési, egészségügyi stb. előírásoknak megfelelően ellenőrizhető és bizonyítható. Ugyanakkor a beépített gén vagy gének helyzetét a gazdakromoszómában ki lehet választani úgy, hogy a beültetett T-DNS ne okozzon semmiféle génmutációt, és olyan gazdagének közelében helyezkedjen el, amelyeket esetleg az új génnel kapcsolatos további nemesítési lépésekben más partnerekbe együttesen át lehet keresztetni.

Ezek után érdemes föltennünk a kérdést: Az ilyen növények is veszélyes genetikailag módosított élőlények: GMO-k? És ha igen, akkor mennyiben különböznek a földjeinken termelt hibrid haszonnövényeinktől?

Végül térjünk még vissza egy pillanatra a baktériumok szexcsatornáihoz. A kórokozó *Xanthomonas* TALE transzkripció faktorának példáján láttuk, hogy az új generációs nemesítésnek már a T-DNS-re sincs szüksége. Egy módosított TALEN fehérje segítségével bármely olyan baktériumból, amely képes azt szexcsatornáin a növényi sejtekbe, pl. petesejtbe juttatni, helyspecifikus mutációt lehet készíteni elvileg bármely génben. Így pl. elegendő inaktíválni, „kiűtni” egy olyan gént, amely egy kórokozóval szemben érzékenységet okoz, vagy gátolja a fajok közötti sikeres megtermékenyítést, vagy a hibridek apomixisét, vagy esetleg allergia (pl. búzaglutén fehérjével, szója és bab tripszingátlókkal szembeni reakciók) kialakulásában játszhat szerepet. Mivel a TALE faktoroknak és az őket növényekbe juttató baktérium szexcsatornáinak rendkívül sok változata ismert, a hasonló alkalmazásokat célzó további fejlesztések száma jelenleg beláthatatlan. Szemben a T-DNS transzformációval, a TALEN fehérjékkel végzett génmódosítások a legjobb esetben egyetlen bázispár megváltoztatását vagy eltávolítását eredményezik. Mivel a genetika és az örökítőanyag, a DNS legkisebb egysége egy nukleotid, ennél nagyobb pontossággal már nem lehet molekuláris módszerekkel a gének módosítását végrehajtani.

Albert Einstein-t saját korában sokan kritizálták és gúnyolták relativitáselméletének a kívülálló számára megfoghatatlan bonyolultsága miatt. Ugyan az $E=mc^2$ képlet látszólag mindenki számára érthető volt, mégis a képlet mögött megbúvó elmélet bevonulásához a köztudatba (de nem megértéséhez) több évtizedre volt szükség. A GM növények esetében sokkal kevesebb törekvés volt annak közkeletű ismertetésére, hogy milyen tudományos eredmények alapján vált lehetővé elkészítésük, és hogyan került sor egyre terjedő gyakorlati alkalmazásukra. Szemben az einsteini teóriát fegyverré fejlesztő atomfizikával, a molekuláris növénybiológia fejlődését követően elterjedő GMO-k fogyasztása és fölhasználása nem okozott az emberiség elmúlt 25 éves történetében semmi olyan tragédiát, amely valóban a növényi GMO-k tulajdonságai és nem politikai megítélésük vagy helytelen fölhasználásuk miatt történt volna. Természetesen, mint az atomfizika vagy bármely más tudományág esetén, a GMO-k emberiség elleni alkalmazásait nagy szigorral gátolni és ellenőrizni kell. Semmi nem indokolja azonban azt, hogy eleve kizárjuk törvényeinkkel lehetséges mezőgazdasági alkalmazásukat, mert ezzel elvesztjük azokat az előnyöket, amelyeket a tudomány rohamos fejlődésén alapuló hosszú távú fölhasználásuk egyre nyilvánvalóbban bizonyít (Masip et al. 2013; Devos et al. 2014; Kok et al. 2014; Lusser et al. 2014; Pauwels et al. 2014; Pollock és Hails 2014).

Einstein a tudomány haladását követni képtelen kritikusaiknak kérdéseire egyszerűen válaszolta: „A világon csak két dolog végtelen, az univerzum és az emberi butaság. De az univerzumban nem vagyok biztos...”. E fejezetek szerzője még mindig (talán naivan) hisz abban, hogy az emberi kíváncsiság, tudásszomj és racionális mérlegelő képesség – a fejezetcím alatti Marie Curie-idézettel összhangban – megcáfolhatja a „végtelen” mosolyt fakasztó einsteini definíciót. Ezért reméli, hogy e három tudománytörténeti fejezet elolvasása segít annak megértésében is, hogy a genetikai módosítás nem egy öröki, hanem egy természetes folyamat, amelyet a kutatás nem az emberiség ellen, hanem annak szolgálatában próbál hasznosítani.

Felhasznált irodalom

- Adler, K.–Beyreuther, K.–Fanning, E.–Geisler, N.–Gronenborn, B.–Klemm, A.–Müller-Hill, B.–Pfahl, M.–Schmitz, A. (1972) How lac repressor binds to DNA. *Nature* 237: 322–327.
- An, D.–Oh, S. F.–Olszak, T.–Neves, J. F.–Avci, F. Y.–Erturk-Hasdemir, D.–Lu, X.–Zeissig, S.–Blumberg, R. S.–Kasper, D. L. (2014) Sphingolipids from a symbiotic microbe regulate homeostasis of host intestinal natural killer T cells. *Cell* 156: 123–133.
- Bacchetti, S.–Graham, F. (1977) Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 1590–1594.
- Baker, B.–Schell, J.–Lörz, H.–Fedoroff, N. (1986) Transposition of the maize controlling element *Activator* in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4844–4848.
- Baker, B.–Coupland, G.–Fedoroff, N.–Starlinger, P.–Schell, J. (1987) Phenotypic assay for excision of the maize controlling element *Ac* in tobacco. *EMBO J* 6: 1547–1554.
- Balassa, G. (1963) Genetic transformation of *Rhizobium*: A review of the work of R. Balassa. *Bacteriol Rev* 27: 228–241.
- Beaucage, S. L.–Caruthers, M. H. (1981) Deoxynucleoside phosphoramidites – a new class of key Intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett* 22: 1859–1862.
- Bechtold, N.–Ellis, J.–Pelletier, G. (1993) *In planta* Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci* 316: 1194–1199.
- Bedell, V. M.–Wang, Y.–Campbell, J. M.–Poshusta, T. L.–Starker, C. G.–Krug II, R. G.–Tan, W.–Penheiter, S. G.–Ma, A. C.–Leung, A. Y.–Fahrenkrug, S. C.–Carlson, D. F.–Voytas, D. F.–Clark, K. J.–Essner, J. J.–Ekker, S. C. (2012) In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system. *Nature* 491: 114–118.
- Benfey, P. N.–Chua, N. H. (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244: 174–181.
- Berget, S. M.–Moore, C.–Sharp, P. A. (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3171–3175.
- Boch, J.–Scholze, H.–Schornack, S.–Landgraf, A.–Hahn, S.–Kay, S.–Lahaye, T.–Nickstadt, A.–Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326: 1509–1512.

- Boch, J.–Bonas, U. (2010) Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function. *Annu Rev Phytopathol* 48: 419–436.
- Bolivar, F.–Rodriguez, R. L.–Green, P. J.–Betlach, M. C.–Heynecker, H. L.–Boyer, H. W.–Crasa, J. H.–Falkow, A. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95–113.
- Braun, A. C. (1941) Development of secondary tumor and tumor strands in the crown-gall of sunflowers. *Phytopathology* 31: 135–149.
- Braun, A. C. (1950) Thermal inactivation studies on the tumor inducing principle in crown-gall. *Phytopathology* 40: 3.
- Bravo-Angel, A. M.–Gloeckler, V.–Hohn, B.–Tinland, B. (1999) Bacterial conjugation protein MobA mediates integration of complex DNA structures into plant cells. *J Bacteriol* 181: 5758–5765.
- Broothaerts, W.–Mitchell, H. J.–Weir, B.–Kaines, S.–Smith, L. M.–Yang, W.–Mayer, J. E.–Roa-Rodríguez, C.–Jefferson, R. A. (2005) Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 433: 629–633.
- Buchanan-Wollaston, V.–Passiatore, J. E.–Cannon, F. (1987) The mob and oriT mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. *Nature* 328: 172–175.
- Bulgakov, V. P.–Kiselev, K. V.–Yakovlev, K. V.–Zhuravlev, Y. N.–Gontcharov, A. A.–Odintsova, N. A. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of sea urchin embryos. *Biotechnol J* 1: 454–461.
- Bundock, P.–den Dulk-Ras, A.–Beijersbergen, A.–Hooykaas, P. J. (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14: 3206–3214.
- Cao, J.–Schneeberger, K.–Ossowski, S.–Günther, T.–Bender, S.–Fitz, J.–Koenig, D.–Lanz, C.–Stegle, O.–Lippert, C.–Wang, X.–Ott, F.–Müller, J.–Alonso-Blanco, C.–Borgwardt, K.–Schmid, K. J.–Weigel, D. (2011) Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nat Genet* 43: 956–963.
- Carlson, P. S.–Smith, H. H.–Dearing, R. D. (1972) Parasexual interspecific plant hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2292–2294.
- Cech, T. R. (1990) Self-splicing of group I introns. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543–568.
- Chauthaiwale, V. M.–Therwath, A.–Deshpande, V. V. (1992) Bacteriophage lambda as a cloning vector. *Microbiol Rev* 56: 577–591.
- Chilton, M. D.–Drummond, M. H.–Gordon, M. P.–Merlo, D. J.–Montoya, A. L.–Sciaky, D.–Nutter, R.–Nester, E. W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of tumorigenesis. *Cell* 11: 263–271.
- Chilton, M. D.–Drummond, M. H.–Merlo, D. J.–Sciaky, D. (1978) Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature* 275: 147–149.
- Cho, I.–Blaser, M. J. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 13: 260–270.
- Chow, L. T.–Gelinas, R. E.–Broker, T. R.–Roberts, R. J. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12: 1–8.

- Citovsky, V.–Kozlovsky, S. V.–Lacroix, B.–Zaltsman, A.–Dafny-Yelin, M.–Vyas, S.–Tovkach, A.–Tzfira, T. (2007) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol* 9: 9–20.
- Cocking, E. C. (1961) Properties of isolated plant protoplasts. *Nature* 191: 780–782.
- Collins, J.–Hohn, B. (1978) Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage λ heads. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4242–4246.
- De Greve, H.–Leemans, J.–Hernalsteens, J.-P.–Thia-Toong, L.–De Beuckeleer, M.–Willmitzer, L.–Otten, L.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1982) Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase, from tobacco crown galls after deletion of tumour-controlling functions. *Nature* 300: 752–755.
- Depicker, A.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1978) Homologous sequences in different Ti plasmids are essential for oncogenicity. *Nature* 275: 150–152.
- De Vadder, F.–Kovatcheva-Datchary, P.–Goncalves, D.–Vinera, J.–Zitoun, C.–Duchamp, A.–Bäckhed, F.–Mithieux, G. (2014) Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits. *Cell* 156: 84–96.
- Devos, Y.–Aguilera, J.–Diveki, Z.–Gomes, A.–Liu, Y.–Paoletti, C.–du Jardin, P.–Herman, L.–Perry, J. N.–Waigmann, E. (2014) EFSA's scientific activities and achievements on the risk assessment of genetically modified organisms (GMOs) during its first decade of existence: looking back and ahead. *Transgenic Res* 23: 1–25.
- Eberwine, J.–Sul, J.-Y.–Bártfai, T.–Kim, J. (2014) The promise of single-cell sequencing. *Nat Meth* 11: 25–27.
- Ephrussi, B.–Weiss, M. (1965) Interspecific hybridization of somatic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 53: 1040–1042.
- Fedoroff, N.–Wessler, S.–Shure, M. (1983) Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. *Cell* 35: 235–242.
- Fehér, A.–Dudits, D. (1994) Plant protoplasts for cell fusion and direct DNA uptake: culture and regeneration systems. In: Vasil, I. K.–Thorpe, T. A. (eds) *Plant cell and tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 71–118.
- Feldmann, K. A.–Marks, M. D. (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol Gen Genet* 208: 1–9.
- Fernandez-Gonzalez, E.–Backert, S. (2014) DNA transfer in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 49: 594–604.
- Fondell, J. D.–Ge, H.–Roeder, R. G. (1996) Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8329–8333.
- Gabor, M.–Hotchkiss, R. D. (1966) Manifestation of linear organization in molecules of pneumococcal transforming DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1441–1448.
- Gautheret, R. J. (1959) *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation*. Masson et Cie, Paris.
- Gielen, J.–De Beuckeleer, M.–Seurinck, J.–Deboeck, F.–De Greve, H.–Lemmers, M.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1984) The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J* 3: 835–846.
- Gilbert, W.–Müller-Hill, B. (1966) Isolation of the lac repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1891–1898.

- Hamilton, A. J.–Baulcombe, D. C. (1999) A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952.
- Haseloff, J.–Siemering, K. R.–Prasher, D. C.–Hodge, S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2122–2127.
- Heintz, C.–Mair, M. (2014) You are what you host: microbiome modulation of the aging process. *Cell* 156: 408–411.
- Hellens, R.–Mullineaux, P.–Klee, H. (2000) Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5: 446–451.
- Hernalsteens, J.-P.–van Vliet, F.–De Beuckeleer, M.–Depicker, A.–Engler, G.–Lemmers, M.–Holsters, M.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1980) The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* 287: 654–656.
- Herrera-Estrella, L.–Depicker, A.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209–213.
- Hinnen, A.–Hicks, J. B.–Fink, G. R. (1978) Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1929–1933.
- Hohn, B.–Murray, K. (1977) Packaging recombinant DNA molecules in bacteriophage particles *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3259–3263.
- Igali, S. (2002) A lisenkoizmus Magyarországon. *Valóság* 3: 40–59.
- Jefferson, R. A.–Kavanagh, T. A.–Bevan, M. W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907.
- Jiang, D.–Zhu, W.–Wang, Y.–Sun, C.–Zhang, K. Q.–Yang, J. (2013) Molecular tools for functional genomics in filamentous fungi: recent advances and new strategies. *Biotechnol Adv* 31: 1562–1574.
- Kahl, G.–Schell, J. (1982) *Molecular biology of plant tumors*. Academic Press, New York.
- Katagiri, F.–Chua, N. H. (1992) Plant transcription factors: present knowledge and future challenges. *Trends Genet* 8: 22–27.
- Kelleher III, R. J.–Flanagan, P. M.–Kornberg, R. D. (1990) A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61: 1209–1215.
- Kleckner, N.–Chan, R. K.–Tye, B. K.–Botstein, D. (1975) Mutagenesis by insertion of a drug-resistance element carrying an inverted repetition. *J Mol Biol* 97: 561–575.
- Klein, T. M.–Wolf, E. D.–Wu, R.–Sanford, J. C. (1987) High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70–73.
- Köhler, G.–Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495–497.
- Kok, E. J.–Pedersen, J.–Onori, R.–Sowa, S.–Schauzu, M.–De Schrijver, A.–Teeri, T. H. (2014) Plants with stacked genetically modified events: to assess or not to assess? *Trends Biotechnol* 32: 70–73.
- Koncz, C. (2006) Dedication. George P. Rédei: *Arabidopsis* geneticist and polymath. *Plant Breeding Reviews* 26: 1–34.
- Koncz, C.–Chua, N.-H.–Schell, J. (1992) *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore.

- Koncz, C.–Kreutzaler, F.–Kálmán, Z.–Schell, J. (1984) A simple method to transfer, integrate and study expression of foreign genes, such as chicken ovalbumin and alpha-actin in plant tumours. *EMBO J* 3: 1929–1937.
- Koncz, C.–Martini, N.–Mayerhofer, R.–Koncz-Kálmán, Z.–Körber, H.–Rédei, G. P.–Schell, J. (1989) High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8467–8471.
- Koncz, C.–Mayerhofer, R.–Koncz-Kálmán, Z.–Nawrath, C.–Reiss, B.–Rédei, G. P.–Schell, J. (1990) Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana*. *EMO J* 9: 1337–1346.
- Koncz, C.–Olsson, O.–Langridge, W. H.–Schell, J.–Szalay, A. A. (1987) Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 131–135.
- Koncz, C.–Schell, J.–Rédei, G. P. (1992) T-DNA transformation and insertion mutagenesis. In: Koncz, C.–Chua, N. H.–Schell, J. (eds) *Methods in Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore, 224–273.
- Koornneef, M.–van Eden, J.–Hanhart, C. J.–Stam, P.–Braaksma, F. J.–Feenstra, W. J. (1983) Linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *J. Hered* 74: 265–272.
- Kondorosi, A.–Kondorosi, E.–John, M.–Schmidt, J.–Schell, J. (1991) The role of nodulation genes in bacterium-plant communication. *Genet Eng* 13: 115–136.
- Kornberg, R. D. (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868–871.
- Laimer, M.–Rücker, W. (2003) *Plant Tissue Culture. 100 years since Gottlieb Haberlandt*. Springer, Wien–New York.
- Lanka, E.–Wilkins, B. M. (1995) DNA Processing Reactions in Bacterial Conjugation. *Annu Rev Biochem* 64: 141–169.
- Ledoux, L.–Huart, R.–Jacobs, M. (1974) DNA-mediated correction of thiaminless *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 249: 17–21.
- Lee, R. C.–Feinbaum, R. L.–Ambros, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843–854.
- Lincoln, T. A.–Joyce, G. F. (2009) Self-sustained replication of an RNA enzyme. *Science* 323: 1229–1232.
- Llosa, M.–Schröder, G.–Dehio, C. (2012) New perspectives into bacterial DNA transfer to human cells. *Trends Microbiol* 20: 355–359.
- Lloyd, A. M.–Barnason, A. R.–Rogers, S. G.–Byrne, M. C.–Fraleigh, R. T.–Horsch, R. B. (1986) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* 234: 464–466.
- Lusser, M.–Parisi, C.–Plan, D.–Rodríguez-Cerezo, E. (2014) Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nat Biotechnol* 30: 231–239.
- Mali, P.–Esvelt, K. M.–Church, G. M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods* 10: 957–963.
- Maniatis, T.–Fritsch, E. F.–Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor–New York.

- Masip, G.–Sabalza, M.–Pérez-Massot, E.–Banakar, R.–Cebrian, D.–Twyman, R. M.–Capell, T.–Albajes, R.–Christou P. (2013) Paradoxical EU agricultural policies on genetically engineered crops. *Trends Plant Sci* 18: 312–324.
- Medgyesy, P.–Fejes, E.–Maliga, P. (1985) Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6960–6964.
- Messing, J.–Gronenborn, B.–Müller-Hill, B.–Hofschnetder, P. H. (1977) Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle insertion of a HindII fragment of the *lac* regulatory region in the M13 replicative form in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 3642–3646.
- Meyerowitz, E. M.–Pruitt, R. E. (1985) *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* 229: 1214–1218.
- Meyerowitz, E. M.–Somerville, C. R. (1994) *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor–New York.
- Millar, A. J.–Short, S. R.–Chua, N. H.–Kay, S. A. (1992) A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Cell* 4: 1075–1087.
- Nagy, F.–Kay, S. A.–Boutry, M.–Hsu, M. Y.–Chua, N. H. (1986) Phytochrome-controlled expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco seedlings. *EMBO J* 5: 1119–1124.
- Nordström, K. J.–Albani, M. C.–James, G. V.–Gutjahr, C.–Hartwig, B.–Turck, F.–Paszowski, U.–Coupland, G.–Schneeberger, K. (2013) Mutation identification by direct comparison of whole-genome sequencing data from mutant and wild-type individuals using k-mers. *Nat Biotechnol* 31: 325–330.
- Omirulleh, S.–Mórocz, S.–Dudits, D. (1995) Regeneration of transgenic maize plants from embryogenic protoplasts after polyethylene glycol-mediated DNA uptake. In: Potrykus, I. (ed.) *Gene Transfer to Plants*. Springer, Heidelberg, 99–105.
- Ossowski, S.–Schwab, R.–Weigel, D. (2008) Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J*. 53: 674–690.
- Otten, L.–De Greve, H.–Hernalsteens, J.-P.–Van Montagu, M.–Schieder, O.–Straub, J.–Schell, J. (1981) Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Gen Genet* 183: 209–213.
- Ow, D. W.–De Wet, J. R.–Helinski, D. R.–Howell, S. H.–Wood, K. V.–Deluca, M. (1986) Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* 234: 856–859.
- Paszowski, J.–Shillito, R. D.–Saul, M.–Mandák, V.–Hohn, T.–Hohn, B.–Potrykus, I. (1984) Direct gene transfer to plants. *EMBO J* 3: 2717–2722.
- Paszowski, J.–Baur, M.–Bogucki, A.–Potrykus, I. (1988) Gene targeting in plants. *EMBO J* 7: 4021–4026.
- Pauwels, K.–Podevin, N.–Breyer, D.–Carroll, D.–Herman, P. (2014) Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations. *New Biotechnol* 31: 18–27.
- Pollock, C. J.–Hails, R. S. (2014) The case for reforming the EU regulatory system for GMOs. *Trends Biotechnol* 32: 63–64.
- Pribnow, D. (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 784–788.
- Prody, G. A.–Bakos, J. T.–Buzayan, J. M.–Schneider, I. R.–Bruening, G. (1986) Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231: 1577–1580.

- Przybilski, R.–Gräf, S.–Lescoute, A.–Nellen, W.–Westhof, E.–Steger, G.–Hammann, C. (2005) Functional hammerhead ribozymes naturally encoded in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 1877–1885.
- Rédei, G. P. (1970) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. A review of the genetics and biology. *Bibliogr Genet* 20: 1–151.
- Rédei, G. P. (1975) Arabidopsis as a genetic tool. *Annu Rev Genet* 9: 111–127.
- Rédei, G. P. (1986) Memoirs of Professor Barna Györfy. *Cereal Research Comm.* 14: 404–413.
- Rédei, G. P. (1992) A heuristic glance at the past of Arabidopsis genetics. In: Koncz, C.–Chua, N.–H.–Schell, J. (eds) *Methods on Arabidopsis Research*. World Scientific, Singapore, 1–15.
- Rédei, G. P.–Acedo, G.–Weingarten, H.–Kier, L. D. (1976) Has DNA corrected genetically thiamineless mutants of Arabidopsis? In: Dudits, D.–Farkas, G.–Maliga, P. (eds) *Cell Genetics in Higher Plants*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 91–94.
- Reinholz, E. (1947) Röntgenmutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L.) Hyenh. *Naturwiss* 34: 26–28.
- Rhee, S. Y.–Mutwil, M. (2013) Towards revealing the functions of all genes in plants. *Trends Plant Sci* 2013 Nov 11, doi: 10.1016/j.tplants.2013.10.006.
- Roeder, R. G.–Rutter, W. J. (1969) Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature* 224: 234–237.
- Saiki, R.–Gelfand, D.–Stoffel, S.–Scharf, S.–Higuchi, R.–Horn, G.–Mullis, K.–Erlich, H. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Sanger, F.–Coulson, A. R.–Hong, G. F.–Hill, D. F.–Petersen, G. B. (1982) Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. *J Mol Biol* 162: 729–773.
- Schaller, H.–Gray, C.–Herrman, K. (1975) Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site from the DNA of bacteriophage fd. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 737–741.
- Schell, J.–Koncz, C. (2000) The Ti plasmid and plant molecular biology. In: Kung, S.–D.–Yang, S.–F. (eds) *Discoveries in Plant Biology*. World Scientific, Singapore, 393–410.
- Schwarz-Sommer, Z.–Gierl, A.–Klößen, R. B.–Wienand, U.–Peterson, P. A.–Saedler, H. (1984) The Spm (En) transposable element controls the excision of a 2-kb DNA insert at the wx allele of *Zea mays*. *EMBO J* 3: 1021–1028.
- Shapiro, J. A. ed. (1983) *Mobile Genetic Elements*. Academic Press, New York.
- Shine, J.–Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of Escherichia coli 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc Nat Acad Sci USA* 71: 1342–1346.
- Smith, E. F.–Townsend, C. O. (1907) A plant-tumor of bacterial origin. *Science* 25: 671–673.
- Somerville, C. R. (2001) An early Arabidopsis demonstration. Resolving a few issues concerning photorespiration. *Plant Physiol* 125: 20–24.
- Starlinger, P.–Saedler, H. (1972) Insertion mutations in microorganisms. *Biochimie* 54: 177–185.
- Strathern, J. N.–Jones, E. W.–Broach, J. R. (1981) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor–New York.
- Svab, Z.–Hajdukiewicz, P.–Maliga, P. (1990) Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 8526–8530.

- Szalay, A. A.–Grohmann, K.–Sinsheimer, R. L. (1977) Separation of the complementary strands of DNA fragments on polyacrylamide gels. *Nucleic Acids Res* 4: 1569–1578.
- Szekeres, M.–Németh, K.–Koncz-Kálmán, Z.–Mathur, J.–Kauschmann, A.–Altmann, T.–Rédei, G. P.–Nagy, F.–Schell, J.–Koncz, C. (1996) Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* 85: 171–182.
- Szybalska, E. H.–Szybalski, W. (1962) Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc Natl Acad Sci USA* 48: 2026–2034.
- Takabe, I.–Labib, G.–Melchers, G. (1971) Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften* 58: 318–320.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- Thorpe, T. A. (2007) History of plant tissue culture. *Mol Biotechnol* 37: 169–180.
- Tuteja, N.–Verma, S.–Sahoo, R. K.–Raveendar, S.–Reddy, I. N. (2012) Recent advances in development of marker-free transgenic plants: regulation and biosafety concern. *J Biosci* 37: 167–197.
- Valvekens, D.–van Montagu, M.–van Lijsebettens, M. (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5536–5540.
- Van Montagu, M. (2011) It is a long way to GM agriculture. *Annu Rev Plant Biol* 62: 1–23.
- Venter, J. C. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351.
- Vlad, D.–Kierzkowski, D.–Rast, M. I.–Vuolo, F.–Dello Ioio, R.–Galinha, C.–Gan, X.–Hajheidari, M.–Hay, A.–Smith, R. S.–Huijser, P.–Bailey, C. D.–Tsiantis, M. (2014) Leaf shape evolution through duplication, regulatory diversification, and loss of a homeobox gene. *Science* 343: 780–783.
- Voinnet, O. (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669–687.
- Wassenegger, M.–Heimes, S.–Riedel, L.–Sänger, H. L. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567–576.
- Will, C. L.–Lührmann, R. (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a003707.
- Zaenen, I.–van Larebeke, N.–Touchy, H.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1974) Super-coiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains. *J Mol Biol* 86: 109–127.
- Zambryski, P.–Joos, H.–Genetello, C.–Leemans, J.–Van Montagu, M.–Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J* 2: 2143–2150.
- Zambryski, P. (1988) Basic process underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu Rev Genet* 22: 1–30.

III. Kicsi a ROP, de erős! A növényi kis molekulatömegű ROP GTPázok mint jelátviteli kapcsolók¹

FEHÉR ATTILA

Összefoglalás

A sejtek osztódásának és növekedésének irányultságát a legtöbb sejtmagvas (eukarióta) élőlényben hasonló molekuláris folyamatok szabályozzák. Ennek a szabályozásnak a középpontjában a RHO típusú GTP-kötő fehérjék állnak. A növények azonban speciális, egyedi RHO típusú GTPázokkal (ROP) és hozzájuk kapcsolódó jelátviteli komponensekkel rendelkeznek. Néhány éve laboratóriumunkban mutattuk ki elsőként, hogy a ROP GTPázok képesek egy növény-specifikus kinázsaládtagjainak az *in vitro* aktiválására. Más kísérleteink pedig arra utalnak, hogy maguk a ROP GTPázok is foszforilációs szabályozás alatt állhatnak.

A RHO típusú GTP-kötő fehérjékhez kapcsolódó jelátvitel rendkívül jó példa arra, hogy az evolúció során ugyanannak a feladatnak az ellátására teljesen eltérő molekulák jöttek létre a különböző élőlény-csoportokban, illetve ugyanaz a molekuláris motívum teljesen más molekulákon tölthet be hasonló szerepet. Az alapvető tudományos ismeretek bővítése mellett ezek a kutatások hosszú távon elvezethetnek olyan molekuláris markerek és technológiák kifejlesztéséhez, melyek lehetővé teszik a növények alakjának, fejlődésének és gombakórokozókkal szembeni érzékenységének megváltoztatását.

Summary

Cell polarity plays important roles in the morphogenesis of all eukaryotic organisms and RHO-type GTPases are key regulators of polarity establishment. Plants have unique RHO proteins (ROPs) and unique associated cell signaling components. However, the details of the integration of these components into signaling pathways are hardly known. In our laboratory we demonstrated first that members of a specific group of plant kinases are activated by ROP GTPases *in vitro*. We also provided evidences that ROPs themselves can be regulated by phosphorylation. Studying the signaling through Rho GTPases is very interesting from an evolutionary point of view; it provides examples how evolution used the same proteins/motives for different purposes as well as invented completely new proteins/domains for the same function. Moreover, in a long term, the obtained basic knowledge might be translated into molecular markers and genetic technologies that can be used to alter plant shape/development and to coop with fungal plant pathogens.

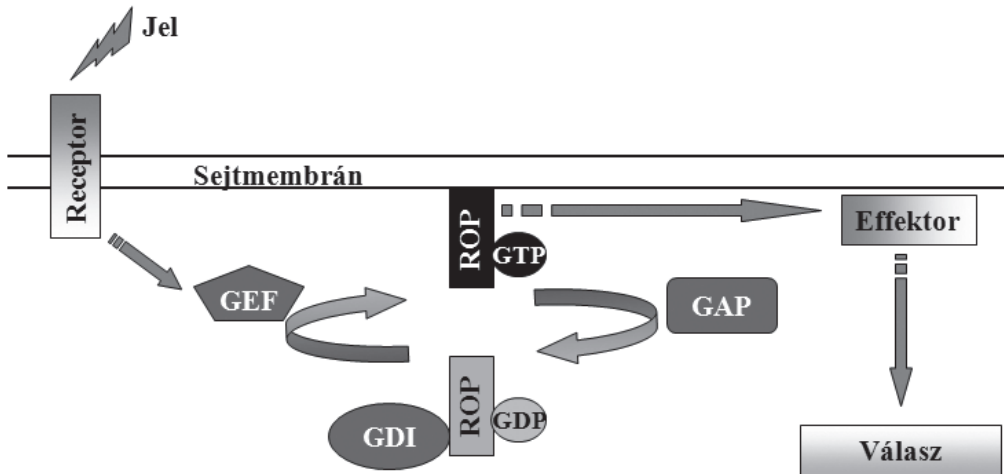
¹ A fejezetben említett saját kutatásokat az Országos Tudományos Kutatási Alap támogatta (OTKA K49491, K101112).

Bevezetés

A növényi egyedfejlődés rugalmasságának szabályozása, a környezettel való összehangjának a megteremtése a sejtek közötti és a sejteken belüli jelátviteli hálózatokon alapul. Ezekről a hálózatokról és szövetvényes kapcsolataikról a mai napig keveset tudunk. Az RHO típusú kis GTP-kötő fehérjék olyan molekuláris kapcsolók, melyek az élesztő- és állati sejtekben már igazoltan szerepet játszanak a különböző jelfogó (receptor) molekulák felől érkező jelek feldolgozásában és továbbításában. Bár ezeknek a fehérjéknek a növényi morfogenezisben és a kórokozókkal szembeni védekezésben betöltött fontos szerepéről az utóbbi években egyre több információ látott napvilágot, a kapcsolódó molekuláris mechanizmusok alig ismertek. Ezek feltárása áll jelenleg kutatásaink homlokterében, aminek a tudományos hátterét és eddigi eredményeit az alábbiakban ismertetem röviden.

A kis molekulásúlyú GTP-kötő fehérjék

A RAS szupercsaládba tartozó kis molekulásúlyú (20–40 kilodalton) GTP-kötő fehérjék (G-fehérjék) az eukarióta sejtek számos alapvető életfolyamatában alapvető szerepet játszanak (Macara et al. 1996; Wennerberg et al. 2005). Csoportosításuk is ennek alapján történik: a RAS családba tartozó fehérjék a sejtosztódásnak és sejt differenciálódásnak, a RAB család tagjai a membrán- és vezikulatranszportnak, az ARF fehérjék a vezikulák összeolvadásának, a RAN fehérjék a sejtmagi transzportnak, míg a RHO típusú G-fehérjék a sejtvázas átrendeződésének fontos szabályozó molekulái. A G-fehérjék jelérzékelő és jeltovábbító funkciója GTP-kötő és -hidrolizáló képességükön alapul. A fehérje GTP-kötött formája jelenti a bekapcsolt, jelátviteli szempontból aktív, míg a GDP-kötött forma a kikapcsolt, jelátviteli szempontból inaktív állapotot. A G-fehérjék GTP-hidrolizáló (GTPáz) aktivitásuk következtében az aktív GTP-kötött és inaktív GDP-kötött konformációk között ingadoznak, ami alkalmassá teszi őket arra, hogy kétállású molekuláris kapcsolóként működjenek. Ehhez azonban szükség van megfelelő szabályozó faktorokra, melyek a GTP/GDP-kötött formák közötti egyensúlyt a megfelelő irányban módosítani tudják (Geyer és Wittinghofer 1997). Három fő G-fehérje-szabályozó faktortípust ismerünk (1. ábra): a guanin nukleotid kicserélő faktorok (angol nevük rövidítése után GEF-ek) a GDP-GTP cserét segítik elő, azaz a G-fehérjéket „bekapcsolt” állapotba hozzák; a GTPáz gyorsító fehérjék (angol nevük rövidítése után GAP-ek) a GTP hidrolízisét segítik, azaz a G-fehérjéket „kikapcsolják”; a guanin nukleotid disszociációt gátló faktorok (angol nevük rövidítése után GDI-k) pedig ebben a kikapcsolt állapotban tartják a G-fehérjéket. Ezek a szabályozó fehérjék a sejt környezetéből vagy belsejéből érkező jeleket érzékelve és „értékelve” a G-fehérjéket tehát ki-be kapcsolják. A bekapcsolt G-fehérjében a GTP-kötés szerkezet- (konformáció-) változást idéz elő. Ebben az aktív konformációban a G-fehérje specifikusan kölcsönhatásban áll más további fehérjemolekulákkal, és ezzel azok funkcióját befolyásolja. Ezeket a változatos funkciójú, a GTP-kötött G-fehérjékhez kapcsolódni



1. ábra. A RAS típusú fehérjék GTPáz-ciklusának és jelátvitelhez való kapcsolódásának egyszerűsített ábrázolása. A RAS fehérjék GTP-kötött állapotban jelátviteli szempontból aktívak, míg GDP-t kötve inaktívak. A két állapot közötti átmenetet három fehérje (GDI, GEF, GAP) szabályozza az alábbi módon.

A kis molekulású GTPázok a citoplazmában GDP-kötött inaktív formában vannak jelen, ezt a konformációt a GDI („guanine nucleotide dissociation inhibitor”) fehérjék stabilizálják.

A sejtmembránon átnyúló receptor adott jel hatására aktiválja a GEF („guanine nucleotide exchange factor”) fehérjét, amely katalizálja a GTPáz GDP-leadását, és elősegíti a GTP-kötést, ezáltal a GTP-áz jelátviteli szempontból aktív konformációt vesz fel, a membrán belső felszínéhez kötődve.

A GTP-kötött GTPáz forma kölcsönhatásba kerül az ún. effektor fehérjékkel, és aktiválja azokat, ezzel kiváltva az adott jelre adandó specifikus sejtválaszt. A GAP („GTPase activating protein”)

katalizálja a GTP GTPáz-általi hidrolízisét, aminek hatására a G-fehérje ismét inaktív,

GDP-kötött formába és a GDI fehérjével kölcsönhatásban a citoplazmába kerül

képes molekulákat végrehajtó (effektor) molekuláknak nevezzük. Ezek a molekulák vagy közvetlenül szabályoznak sejt folyamatokat (pl. membrán-/fehérjetranszport és -fúzió), vagy továbbadják a jelet más jeltovábbító molekuláknak, és így jelátviteli láncokat aktiválnak (pl. génkifejeződés befolyásolása). Míg a RAS szupercsaládba tartozó fehérjék közül a RAB, ARF és RAN családok tagjai elsősorban közvetlenül hatnak más fehérjék működésére, kapcsolatára, sejtben belüli elhelyezkedésére, addig a RAS és a RHO családba tartozó fehérjékről ismert, hogy génműködést befolyásoló jelátviteli hálózatokat is aktiválnak. Mivel a növényekben a RAS család fehérjéi nincsenek jelen, a RHO család képviselői az egyetlen, tényleges jelátviteli aktivitással rendelkező kis molekulatömegű növényi G-fehérjék (Vernoud et al. 2003). A növényi fehérjék külön családot alkotnak a RHO típusú G-fehérjékben belül (Vernoud et al. 2003), melynek elnevezése ROP mint „RHO-of-plants” (az egyszikűekben előforduló ROP fehérjék esetében történeti okokból megmaradt a hagyományos RAC elnevezés, de a rizs, árpa stb. RAC elnevezésű fehérjék – lásd lentebb – is valójában ROP fehérjék).

Az utóbbi évtizedekben a növényi RHO típusú GTP-kötő fehérjék kutatása rendkívül felgyorsult (áttekintésként lásd Craddock et al. 2012). Kimutatták, hogy az állati és élesztősejtekhez hasonlóan ezeknek a fehérjéknek a növényekben is fontos szerepük van a sejtvázas szervezésében, a plazmamembrán NADPH-oxidáz aktivitásának szabályozásában és a génkifejeződés módosításában, és ily módon részt vesznek a sejtek alakjának, polaritásának, osztódásának a regulálásában és a környezeti stresszhatásokra adott válaszok kialakításában (áttekintésként lásd Craddock et al. 2012; Mucha et al. 2011; Yang 2002). Ma már sok potenciális szabályozó és effektor molekulájukat ismerjük (Berken 2006; Nibau et al. 2006), ugyanakkor még nagyon keveset tudunk azokról a jelátviteli hálózatokról, amikben ezekkel együtt részt vesznek (Fehér et al. 2008). Az azonban már bizonyos, hogy mind a ROP GTPázok szabályozó és effektor molekulái, mind az ezekkel kapcsolatos jelátviteli mechanizmusok, illetve aktivált útvonalak jelentősen eltérnek a más eukarióta élőlényekben megismertektől (Nagawa et al. 2010).

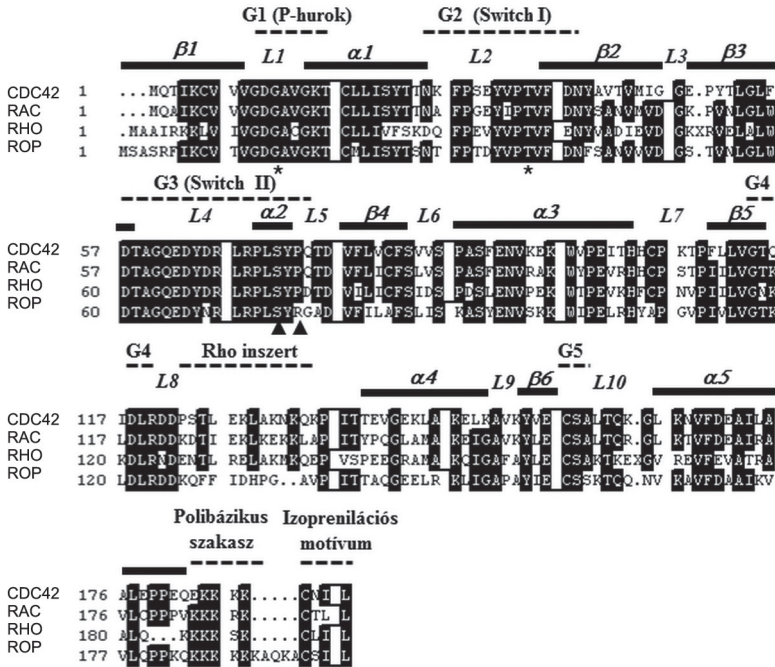
Kutatócsoporthoz néhány éve arra teszünk kísérletet, hogy feltárjuk a ROP GTPázok által közvetített jelátvitelt még ismeretlen, a növényekre jellemző lépéseit, a receptoroktól a génkifejeződésig, elsősorban azokra a fehérjekinázokra koncentrálni, melyek a ROP GTPázokat közvetlenül vagy közvetve szabályozzák, illetve melyeket a ROP GTPázok közvetlenül vagy közvetve szabályoznak. Ezeknek az ismereteknek az alapján egyrészt betekinthejtünk a molekuláris evolúció mechanizmusába (az eukarióta sejtek hasonló mechanizmusainak összevetésével), másrészt jobban megérthetjük azokat az alapvető folyamatokat, amelyek lehetővé teszik a növények számára, hogy a változó környezeti körülményekhez folytonosan alkalmazkodva rendkívüli formagazdagságot hozzanak létre.

Ebben a fejezetben a növényi RHO típusú (ROP) GTPázokhoz kapcsolódó jelátviteli mechanizmusokkal kapcsolatos jelenlegi ismereteket foglalom össze, amihez a ROP GTPázok és egyes fehérjekinázok kapcsolatának az elmúlt néhány évben történt feltárásával kutatócsoportom is hozzájárult.

A növényi ROP GTPázok és jelátviteli aktivitásuk szabályozása

A növényi ROP GTPázok szerkezete

Amint a legtöbb RHO fehérje, a növényi ROP-ok is kb. 200 aminosavból épülnek fel, így molekulatömegük 21–24 kilodalton. Az eukarióta RHO típusú fehérjék aminosavsorrendje nagyon hasonló (2. ábra). Legjellegzetesebb szerkezeti elemük az összes G-fehérjére jellemző úgynevezett G-domén (Berken és Wittinghofer 2008). Ez öt evolúciósan konzerválódott szekvenciamotívumot (G1–G5) tartalmaz, melyek a nukleotid- és Mg^{2+} -kötéshez, valamint a GTP-hidrolízishez szükségesek. A motívumok egyes kulcsaminosavainak a mutációja révén lehetőség van konstitutívan aktív (CA), illetve domináns negatív (DN) fehérjeformák előállítására. Előbbi a GTP-kötött, jelátviteli szempontból aktív, utóbbi pedig a GDP-kötött, inaktív konformációt tartó-



2. ábra. A RHO GTPázok szerkezeti felépítése és fontosabb régióik. Humán CDC42, RAC és RHO, valamint *Arabidopsis* ROP fehérjék konszenzus aminosav-szekvenciáinak illesztése felett a vastag vonalakkal és a betűjelekkel a másodlagos szerkezetet befolyásoló szakaszokat jelöltük ($\beta 1$ – $\beta 6$: béta-lemesek, $\alpha 1$ – $\alpha 5$: alfa-spirálok, L1–L10: hurkok).

A funkcionális régiókat szaggatott vonalakkal jelezzük (további részletek a szövegben)

sítja. A G2 és a G3 motívumokat más néven Switch I és Switch II régióknak is nevezik. Ezek a flexibilis régiók biztosítják azt a GTP-kötés hatására bekövetkező konformációváltozást, ami lehetővé teszi a G-fehérje és effektorai kapcsolódását. A RHO fehérjék sajátos motívuma az ún. RHO-inszert régió, mely csak erre a családra jellemző, és feltehetően fehérje-fehérje kapcsolatokban van szerepe (Dvorsky és Ahmadian 2004; Karnoub et al. 2004). Alapvető jelentősége van a RHO fehérjék jelátviteli funkciójában a C-terminális, ún. hipervariábilis szekvenciaszakasznak is, amely egyrészt egy polibázikus részt tartalmaz, valamint egy lipidmódosítást lehetővé tevő szekvenciamotívumot hordoz (Dvorsky és Ahmadian 2004; Fauré és Dagher 2001). Ez utóbbi biztosítja a GTPáz plazmamembránhoz való reverzibilis (GDI fehérjék által szabályozott) kapcsolódását, ami elengedhetetlen a ROP funkció pontos lokalizálásához a sejtben belül (pl. sejtpolaritás kialakítása és fixálása) (Sorek et al. 2011).

Bár a legtöbb fent említett motívum nagyfokú konzerváltságot mutat az összes eukarióta RHO típusú G-fehérjében, a növényi ROP fehérjék rendelkeznek néhány szerkezeti sajátossággal, amelyeknek feltehetően funkcionális következményei is vannak. Ezek a szerkezeti különbségek egyrészt a RHO-inszert régiót érintik (Berken és

Wittinghofer 2008). Ez a szekvenciaszakasz a növényi ROP GTPázokban jelentősen eltér az állati és élesztő RHO fehérjék hasonló régiójától, ami feltehetően összhangban áll az effektorfehérjék különbözőségével (lásd lejjebb). Egy másik jellegzetes különbség egy az összes ROP GTPáz-ban konzerválódott arginin (az *Arabidopsis* ROP1 esetében ez a 76. pozícióban van), ami a megfelelő pozícióban sem az élesztő-, sem az állati RHO fehérjékben nem fordul elő. Ez az aminosav ráadásul egy potenciális foszforilációs motívum (SYR) része (Berken és Wittinghofer 2008). Ezeknek a szerkezeti sajátosságoknak a jelentőségéről a következőkben még részletesen lesz szó.

A növényi ROP GTPázok funkciói

A RHO típusú GTPázok az élesztő- és állati sejtekben közismerten azokban a sejt folyamatokban vesznek részt, melyek a sejt vázzal kapcsolatosak, pl. sejtek alakváltozása, osztódása, polaritásának kialakulása (Hall és Etienne-Manneville 2002). Emellett azonban részt vesznek génkifejeződés-változáshoz vezető jelátviteli utak aktiválásában, elsősorban fehérje kináz kaskádokon keresztül, valamint egyes állati sejtekben a plazmamembránhoz kötött NADPH oxidáz aktivitását is szabályozzák (Hall és Etienne-Manneville 2002). A növényi ROP GTPázok tanulmányozása során nyilvánvalóvá vált, hogy ezek a fehérjék a növényekben is hasonló szerepet töltenek be, de természetesen ahogy maguk a sejt folyamatok, úgy a ROP GTPázok szerepe és szabályozásának módja is számos növény-specifikus vonást mutat (Brembu et al. 2006; Craddock et al. 2012).

Talán a legrészletesebben vizsgált a ROP GTPázok szerepe a növényi sejtek poláris megnyúlásában, növekedésében (Xu és Scheres, 2005). Ez a folyamat játszódik le pl. a pollencső növekedésekor, illetve a gyökérszőrök morfogenezisé során. Ezekben a polárisan növekedő sejtekben megfigyelhető a ROP GTPázok csúcs közeli, poláris, membránkötött elhelyezkedése, ahol ciklikusan aktiválódva biztosítják a membrán-, valamint sejtanyagokat szállító vezikulák poláris transzportját és excitózisát (Hwang et al. 2005). Mindezt a poláris transzporthoz szükséges mikrotubulus és aktin sejt váz szerveződés és egy a csúcs felé növekvő Ca^{2+} gradiens fenntartásán keresztül valósítják meg (Gu et al. 2005; Qin és Yang 2011), molekuláris szinten még nem minden részletében ismert módon (lásd még később). Hasonló szerepet töltenek be a ROP GTPázok olyan speciális alakú sejtek morfogenezisében, mint amilyenek például a puzzle-szerű alakú rendelkező levél epidermisz sejtek, illetve az elágazó levélszőrök (trichómák) (Qian et al. 2009). Ezeknek a sejteknek a lokális nyúlványait, illetve befűződéseit egyaránt ROP-GTPáz mediált folyamatok szabályozzák, amiben a sejt váznak szintén döntő szerepe van. A közelmúltban kimutatták, hogy a szomszédos epidermisz sejtek közötti kommunikációban (ahol az egyik sejt kitérűmkedik, ott a szomszédos sejtnek be kell fűződnie) a lokális auxin akkumulációnak fontos szerepe van, amit a ROP GTPázok az auxin eflux karrier (a sejtekből az auxinkiráramlást biztosító membráncsatorna) PIN fehérjék lokális felhalmozódásának befolyásolásával érnek el (Xu et al. 2010; Nagawa et al. 2012). A ROP GTPázok szerepe a poláris

auxintranszportra feltehetően általános érvényű. A PIN fehérjék a sejtek membránjában lokálisan elhelyezkedve biztosítják az irányított auxináramlást a növényben. A PIN fehérjék poláris elhelyezkedését a ROP GTPázok az aktinpolimerizáció lokális serkentésével és ennek következtében a PIN fehérje endocitózisának és lebontásának gátlásával, membránba való reciklizációjának az előmozdításával érik el (Craddock és Yang, 2012). A ROP fehérjéknek nemcsak az auxintranszportban, de az auxin-mediált génkifejeződésben is leírták a szerepét az AUX/IAA represszor fehérjék ubikvitin/26S proteoszóma-mediált lebontásának elősegítésén keresztül (Tao et al. 2005). Egy másik növényi hormon, amelynek hatását a ROP GTPázok aktivitása kísérletileg igazoltan befolyásolja, az abszcizinsav (ABA). Igaz ez az abszcizinsav hatására bekövetkező sztómazáródásra, csírázásra, gyökérnövekedésre és génexpressziós változásokra egyaránt (Hwang, Jeon, Hong és Lee 2011; Lemichez et al. 2001; Zheng et al. 2002; Xin, Zhao és Zheng, 2005). A ROP G-fehérjék szerepét kimutatták továbbá a merisztéma-fenntartásban éppúgy, mint a sejt differenciálódásban, mely folyamatokban szintén alapvető szerepet játszanak a növényi hormonok (Fletcher és Meyerowitz 2000; Lavy et al. 2007; Oda és Fukuda 2012).

A növények növekedésének, morfogenezisének és hormonválaszának szabályozása mellett a ROP fehérjéknek fontos a szerepe a növény-kórokozó kapcsolatokban is. Részt vesznek a növények védekezési reakcióiban (Agrawal et al. 2003), amit legrészletesebben a rizs RAC fehérjék esetében vizsgáltak (Chen et al. 2010; Akamatsu et al. 2013; Kim et al. 2012). Az aktív rizs RAC1 fehérjével kölcsönható fehérjékkel kezdve több lépcsőben azonosítottak egy a gombakórokozókkal szembeni védekezésben szerepet játszó protein komplexet, amelyet „defensome”-nak („védekezőkomplex”) neveztek el (Kawano et al., 2010b). Ebben a jelátviteli komplexben számos dajka- illetve scaffold (váz) fehérje mellett a jelátviteli láncban a RAC1 felett álló szabályozó molekulák (CEBiP kitin-kötő fehérje, CERK1 kitinaktivált receptor-szerű kináz, RACGEF1) és az általa aktivált effektor molekulák (MAP-kinázok, RAI1 transzkripció faktor, illetve a lignin szintézisben részt vevő CCR1 enzim) szerepelnek. A jelátvitel eredményeként aktiválódnak a sejt védekezésében szerepet játszó, ún. kórokozó ellenállósági (PR) gének, fitoalexinek szabadulnak fel, illetve megvastagodik a sejtfal. A rizs RAC1 fehérje emellett részt vesz a kórokozó fertőzést megakadályozó ún. hiperszenzitív válaszbán, amely során a növény reaktív oxigénfajták felszabadításával pusztítja el a fertőzött sejtet, megakadályozva a kórokozók továbbterjedését (Kawasaki et al., 1999). Ebben a folyamatban a ROP/RAC GTPázok a szuperoxid anionokat termelő NADPH oxidáz közvetlen aktiválásával, illetve a ROS scavengerek gátlásával vesznek részt (Wong et al. 2004; 2007). A közelmúltban kimutatták, hogy a rizs RAC1 GTPáz kötődik a kórokozókkal szembeni védekezésben központi szerepet betöltő NLR-receptorok egyikéhez, ami a G-fehérjét aktiválja (Kawano et al. 2010a). A jelátvitel további menete azonban még nem ismert.

Mindezek és más, elsősorban *Arabidopsis* ROP GTPázokkal végzett kísérletek egyértelműen igazolják a növényi ROP/RAC GTPázok központi szerepét a kórokozókkal szembeni védekezésben. Érdekes módon azonban ugyanezek a fehérjék elő is segíthetik a fertőzést.

Ralph Hüchelhoven és munkatársai kimutatták, hogy az árpa lisztharmat fertőzést aktív RACB GTPáz túltermelése, illetve a RACB jelátvitel aktiválása elősegíti (és fordítva, a RACB jelátvitel inaktiválása csökkenti) (Schultheiss et al. 2002; 2003). A hipotézis szerint a gomba hifa egy adott sejttel érintkezve valamilyen úton a ROP-jelátvitelt lokálisan aktiválja, ami a sejtmembrán lokális befűződését okozza, lehetővé téve a gomba hifát „befogadó”, a sejttel való érintkezési felületet növelő, hausztórium kialakulását. Ennek a kutatásnak egy részében a mi laboratóriumunk is részt vett, melynek során közösen igazoltuk egy árpa RAC1 effektor kináz (RBK1) lehetséges szerepét a folyamatban (Huesmann et al. 2012, lásd még később).

A fenti, a teljesség igénye nélkül készült lista a ROP GTPázok funkciójáról jól demonstrálja, hogy ezek a kis fehérjék központi helyet foglalnak el a növények/növényi sejtek számos jelátviteli folyamatában és azok integrálásában. A szerteágazó funkcióik megkövetelik jelátviteli aktivitásuk precíz szabályozását, melyet transzkripciós szabályozottságuk (Fehér et al. 2008) mellett poszttranszlációs módosítások és komplex fehérje-fehérje kapcsolataik tesznek lehetővé. Ezek rövid áttekintésére kerül sor a továbbiakban.

A ROP GTPázok szabályozása

A ROP-ok jelátviteli aktiválása

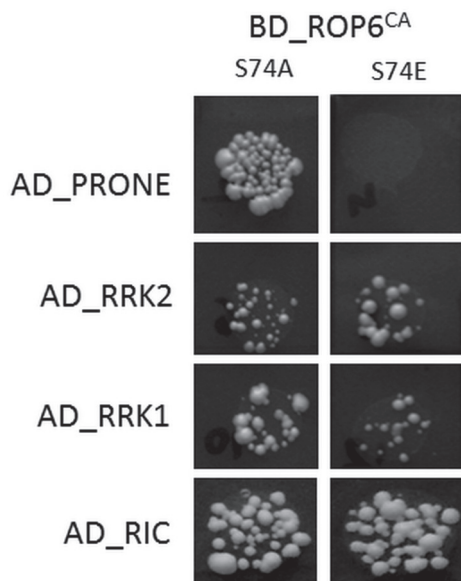
A sejtekben a GTP-koncentráció a GDP-koncentrációt lényegesen meghaladja, így a kis molekulatömegű GTPázok, ide értve a RHO-család tagjait is, a GDP-t spontán GTP-re cserélik. Azonban ez a folyamat igen lassú. A folyamat katalizálását a korábban már említett guanin nukleotid kicserélő faktorok (GEF) végzik, ezzel aktiválva a GTPázokat. Érdekes, hogy ezek az azonos funkciójú, de eltérő szerkezetű szabályozó molekulák az eukarióta élőlények evolúciója során többször és függetlenül jöttek létre. Az állati és élesztősejtek RHO GTPáz-ait aktiváló nagyszámú (több mint 50) GEF molekula nagy része az ún. DH (Dbl-homológ) és PH (pleckstrin homológ) fehérje doméneket tartalmazza (Rossman et al., 2005). A DH régió képezi a GEF katalitikusan aktív részét, ami a GTPáz nukleotidkötő régiójához kapcsolódva segíti elő a nukleotidok kicserélődését, amit a PH domén jelenléte tovább erősít.

A növényi genomok számítógépes analízise során azonban hasonló szerkezetű, DH-PH domén kapcsolódást mutató fehérjéket nem tudtak azonosítani, így az utóbbi évekig nem voltak elképzeléseink arról, hogy hogyan is történhet a ROP GTPázok aktiválása. Arra az állati sejtek esetében is van példa, hogy DH-PH domént nem tartalmazó fehérjék is bírhatnak RHOGEF aktivitással (Meller 2005). A kétkomponensű Dock18-ELMO fehérje komplex, egyik tagja hordoz egy GEF aktivitású Dock-homológ 2 (DHR2) domént, amely a PH domént tartalmazó ELMO fehérjékhez kapcsolódva hoz létre egy aktív enzimet (Brugnera et al. 2002). Az *Arabidopsis* genom egy DHR2 domént hordozó fehérjét (SPIKE1) és számos ELMO típusú fehérjét kódol (Qiu et al. 2002). A SPIKE1 fehérjéről ki is mutatták, hogy *in vitro* ROPGEF aktivitással

rendelkezik, és *in vivo* részt vesz a ROP GTPázok aktiválásában és az aktin sejtvez szerveződésének szabályozásában (Basu et al. 2008). Ez a szerepe azonban nem általános jellegű. A SPIKE1 fehérje nem szükséges számos ROP-függő folyamat normális lezajlásához, így feltételezhető volt, hogy a növényekben más ROPGEF molekuláknak is létezniük kell. Ezt Berken és munkatársai (Berken et al. 2005), majd nem sokkal ezután Gu és munkatársai (Gu et al. 2006) igazolták is, amikor élesztő két-hibrid rendszer segítségével azonosítottak olyan fehérjéket, amelyek viszonylag nagy affinitással kötődtek nukleotidot nem tartalmazó ROP GTPáz molekulákhoz. A nukleotidmentes GTPázokkal való erős kapcsolat pedig a GEF molekulákra jellemző. Az azonosított fehérjék *Arabidopsis*-ban egy 11 tagú család tagjai. A tisztított fehérjékről kimutatták, hogy valóban van ROPGEF aktivitásuk (Berken et al. 2005), és a növényi sejtekben túltermeltetve számos ROP-függő folyamatot aktiválnak (Gu et al. 2006).

Ezek a fehérjék szerkezetükben jelentősen eltérnek a DH-PH domént tartalmazó GEF fehérjétől, és aktivitásukat egy speciális fehérjerégiójuknak köszönhetik, melyet PRONE („plant-specific ROP nucleotide exchanger”) doménnek neveztek el (Berken et al. 2005). A szerkezeti különbségek ellenére a nukleotidcserélődés molekuláris mechanizmusa azonban mindkét GEF molekulatípus esetében nagyon hasonló (Thomas et al. 2007). Érdekes azonban, hogy míg a DH-PH domént tartalmazó GEF-ek *in vitro* képesek a növényi ROP GTPázok nukleotidcseréjét katalizálni, addig ez fordítva nem igaz: a PRONE domén csak a növényi ROP GTPázok esetében hatásos, a rokon állati RAC GTPázok esetében nem (Fricke és Berken 2009). A növényi és állati RHO-típusú GTPázok szerkezete rendkívül konzervált, azonban az aminosavsorrendjükben van néhány jellegzetes különbség is (ezek közül 34 olyan, amely a molekula felszínén van, és így befolyásolhatja a más molekulákhoz való kapcsolódást). Az *Arabidopsis* ROP4 és PRONE8 komplex kristályszerkezetének meghatározását követően Fricke és Berken (2009) kimutatták, hogy ezek közül a 68. pozícióban levő aszparagin és a 76. pozícióban levő arginin azok, melyek a ROP-PRONE kötés és annak specificitása szempontjából alapvető fontosságúak. Amennyiben ezekben a pozíciókban egy mutáns humán RAC1 fehérje is ezeket az aminosavakat hordozta, PRONE8 szubsztráttá vált, és fordítva, az ezekben a pozíciókban a RAC1-re jellemző aminosavakat (68. aszparaginsav, illetve 76. proline) hordozó ROP4 érzéketlenné vált a PRONE8 aktivitással szemben.

Ekkor kapcsolódtunk be magunk is a kutatásokba, ugyanis a ROP GTPázoknak ez a régiója a ROP GTPázok és kinázok kapcsolata szempontjából is érdekes. Az állati RAC1 GTPáz esetében kimutatták, hogy a 71. pozícióban levő szerin aminosavat az Akt kináz foszforilálja, és ezzel befolyásolja a molekula GTP-kötő képességét (Kwon et al. 2000). Később azt is kimutatták, hogy a GSK3 kináz is foszforilálhatja ezt a szerin aminosavat, amivel a RAC1 GTPáz effektor kinázokhoz való kötődését szabályozza (gátolja) (Rehani et al. 2009). Ez a szerin és a szomszédos aminosavak magas szinten konzerválódtak az eukarióta RHO-típusú G-fehérjékben, beleértve a növényi ROP GTPázokat is. Feltételezhető volt tehát, hogy a növényi ROP GTPázok is foszforilációs szabályozás alatt állhatnak. Ennek a hipotézisnek az igazolására a lucerna ROP6 fehérjében olyan mutációkat alakítottunk ki, melyek közül az egyik a foszforilációt megakadályozza (a megfelelő, ez esetben a 74. pozícióban levő szerin alaninra



3. ábra. A lucerna ROP6 fehérje S74 foszforilációjának potenciális hatása a GTPáz más fehérjékhez történő kapcsolódására. Élesztő két-hibrid rendszerben vizsgáltuk a 74. pozícióban mutáns ROP6 GTPáz kölcsönhatását az aktivátor GEF fehérje PRONE doménjével, illetve három effektor fehérjével (RRK1 és 2, RIC). Az S74A mutáció esetében a szerin-alanin csere megakadályozza az esetleges foszforilációt ebben a pozícióban, az S74E szerin-glutaminsav csere viszont a foszforilált 74. szerin töltését mimikálja. Az élesztő két-hibrid rendszer alkalmazásához a mutáns ROP fehérjét a Gal4 transzkripció faktor DNS-kötő doménjéhez (BD), míg a lehetséges partner fehérjét ugyanazon faktor aktiváló doménjéhez (AD) kapcsoltuk. Az élesztőkolóniák megjelenése az adott fehérje-fehérje kombinációban pozitív kölcsönhatást jelez. Ez a BD_ROP6 S74E és AD_PRONE kombinációban elmarad, ami a kölcsönhatásnak a mutáció hatására megszűnését jelenti

cseréltük; S74A mutáció), míg a másik a foszforilációt egy negatívan töltött aminosav (pl. glutaminsav) beépítésével utánozza (S74E mutáció) (Fodor-Dunai et al. 2011). Élesztő két-hibrid rendszerben teszteltük ezeknek a mutáns ROP formáknak a szabályozó, illetve effektor molekulákkal való kölcsönhatását (3. ábra). Azt tapasztaltuk, hogy az effektor molekulák kötésében nem volt lényeges változás, ugyanakkor a ROP-GEF molekulák a foszforilációt imitáló S74E ROP mutánszal nem tudtak kapcsolatot létesíteni, és így természetesen azok nukleotidkicserélődését sem tudták serkenteni (Fodor-Dunai et al. 2011). Szerkezeti modellek felhasználásával is sikerült alátámasztani, hogy a 74. szerin foszforilálása olyan térszerkezeti változást okoz, amely megakadályozza a ROPGEF és a ROP megfelelő aminosavai közötti kötést (Fodor-Dunai et al. 2011). Azt, hogy a foszforiláció *in vivo* is gátolhatja a ROP aktivációt, néhány pollencsövekben való tranzies génkifejeződést követően igazoltuk (Fodor-Dunai et al. 2011; 4. ábra). A ROP GTPázok a pollencső-növekedés fontos szabályozói: a pol-

lencső csúcsánál lokalizálódnak, és ott lokálisan aktiválódva biztosítják a növekedés polaritását, a növekvő sejtmembrán és sejtfal szintéziséhez szükséges anyagok irányított transzportját. Ha a ROP GTPázokat túltermeltetjük a pollencsőben, akkor nemcsak a csúcsi részen, hanem egy lényegesen nagyobb régióban megjelenik a fehérje, és mindenütt aktiválódva a polaritás elvesztését és a pollencső minden irányú, ballonszerű növekedését eredményezi. Kísérleteinkben a lucerna ROP6 GTPáz, illetve S74A és S74E mutáns formáit túltermeltettük dohány pollencsővekben egy pollen-specifikus promóter segítségével. A vad típusú forma, a várakozásnak megfelelően, a pollencsőben jelen levő ROPGEF fehérjék hatására a pollencső csúcsánál nagyobb területen aktiválódott, ami a pollencső végén ballonszerű kiszélesedést eredményezett (4. ábra A). Ez ugyanígy történt a nem foszforilálható S74A mutáns esetében (4. ábra B), azonban elmaradt az S74E mutáns alkalmazásakor (4. ábra C). Ennek pedig a legvalószínűbb oka, hogy a foszforilációt imitáló mutáció *in vivo* is megakadályozta a GEF molekulákhoz való kötődést és így a ROP G-fehérjék aktiválódását.

Ezek az eredmények közvetve arra utalnak, hogy a ROP GTPázok a növényekben is foszforilációs szabályozás alatt állhatnak. Jelenleg még nem ismerjük azokat a fehérje kinázokat, melyek a ROP GTPázokat a 74. szerin oldalláncon foszforilálni képesek, és nem ismert ennek a potenciális szabályozási lépésnek a biológiai jelentősége sem. Csoportunkban jelenleg ezek azok közé a kérdések közé tartoznak, amelyeket szeretnénk az elkövetkező években megválaszolni.

A RHO-típusú GTPázok foszforilációs szabályozása tehát feltehetően eltér a növényi és állati/élesztősejtekben, ami nagy valószínűséggel összefügg az abban részt vevő fehérjék és a szabályozásuk független evolúciójával. A RHO típusú GTPázok spontán nukleotidlecserélődésének lassúsága és a szabályozásának szükségessége minden eukarióta élőlényben magával vonta a nukleotidkicserélődést katalizáló faktorok megjelenését. Míg az élesztő- és az állati sejtekben a RHO GTPázok aktiválását a DH-PH doménnel rendelkező GEF fehérjék végzik, addig a növényekben egy eltérő szerkezetű, de hasonló funkciójú domén, a PRONE domén fejlődött ki. Ennek a doménnek az evolúciós megjelenése együtt járt a RHO GTPázok szerkezeti változásával, vagyis a PRONE domén kötődéséhez szükséges aminosavak (68. aszparagin, 76. arginin) megjelenésével. Ezek az aminosavak azonban egy evolúciósan konzerválódott foszforilációs motívum közvetlen közelében találhatóak, ami lehetővé teszi a ROP-PRONE kötés foszforilációs szabályozását. Mivel az állati (és élesztő) RHO GTPázok esetében a 68. aszparagin és 76. arginin a GEF kötés tekintetében nem kitüntetettek (ezért tudják az állati GEF fehérjék a növényi ROP GTPázokat is aktiválni), ez a szabályozási szint csak a növényekre jellemző. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy ez a régió az állati RHO GTPázok esetében az effektor kinázok kötésében tölt be nagyobb szerepet. Amint a továbbiakban látni fogjuk, a növényekben az effektor kinázok és a ROP GTPázok kapcsolata szintén speciális és a többi eukarióta élőlényben megfigyeltetől eltérő.

Bár számuk, változatosságuk és fontos biológiai funkciójuk alapján a PRONE domént hordozó fehérjéket tartjuk a növényi ROP GTPázok fő aktivátorainak, az elmúlt évben kimutatták, hogy a növények is rendelkeznek a DOCK-ELMO komplexen kívül egyes állati RHOGEF fehérjékhez hasonló, DH és PH doméneket hordozó ROP

GEF fehérjékkel. A rizs genom tanulmányozása vezetett ezeknek a humán SWAP70 fehérjével rokon GEF aktivitású fehérjéknek az azonosításához (Yamaguchi et al. 2012). A SWAP70 sajátossága, hogy a molekulán a DH és a PH domének relatív elhelyezkedése fordított (PH-DH) a többi RHOGEF fehérjéhez képest. A rizs SWAP70 homológ fehérjék is ilyenek, és bizonyítottan rendelkeznek ROPGEF aktivitással, és feltehetően ennek köszönhetően szabályozzák a rizs RAC1 GTPáz által regulált szuperoxid-anion-képződést.

Mint a ROP GTPázok aktivátorai, a ROPGEF fehérjék biztosítják elsősorban a kapcsolatot a ROP GTPázok és a jelfelfogó receptor fehérjék között. A receptor-RHO-GEF-RHO kapcsolat állati és élesztősejtekben viszonylag jól ismert és számos esetben már feltárt (Schiller 2006). Ezzel szemben az ezzel kapcsolatos ismereteink növényekben még nagyon szegényesek, nem utolsósorban azért, mivel a ROPGEF fehérjék azonosítására még csak néhány éve került sor. Míg az állati sejtek esetében a sejtfelszíni receptorok egy jelentős része ún. G-protein kapcsolt receptor fehérje (GPCR) vagy receptor tirozin kináz (RTK), addig növényekben ezek a típusú molekulák lényegében hiányoznak (Assaad 2001). A legtöbb sejtfelszíni növényi receptor a receptorszerű szerin/treonin kinázok (RLK) csoportjába tartozik (Shiu és Bleecker 2001). Ezeknek a száma igen nagy (*Arabidopsis*-ban kb. 600), és a többségük funkciójáról semmit sem vagy csak keveset tudunk. A növényekben feltehetően ezek a fehérjék érzékelik és közvetítik a sejten kívülről érkező jeleket a ROP GTPáz kapcsolókhöz a ROPGEF-eken keresztül. Erre már ismerünk is néhány példát. Fentebb már említésre került a ROP GTPázoknak a poláris pollencső-növekedésben betöltött szerepe. Mivel ez az egyik legrészletesebben tanulmányozott növényi sejtpolarizációs kísérleti modell rendszer, nem csoda, hogy a ROP-okat magában foglaló jelátviteli hálózatok tekintetében is itt áll rendelkezésre a legtöbb adat. A pollensejtekben kifejeződő receptorszerű kinázok speciális csoportot alkotnak, melyeket a pollen receptorkináz (PRK) névvel jelölnek (Zou et al. 2011). Ezeket legrészletesebben paradicsomban vizsgálták, ahol megállapították, hogy ezek a receptorok a bibe által kiválasztott kisméretű molekulákat kötve aktiválódnak, és így biztosítják a pollencső irányított növekedését az embriózsák felé. Ebben a folyamatban fontos szerepet játszik, hogy a PRK fehérjék kölcsönhatásban vannak a ROPGEF aktivitású PRONE domént tartalmazó KPP („Kináz partner protein”) molekulákkal, amelyeken keresztül a ROP GTPázokat aktiválják, és végső soron a poláris pollencső-növekedést szabályozzák (Kaothien et al. 2005; Zhang és McCormick 2008). A pollenben kifejeződő ROPGEF fehérjék, így a paradicsom KPP C-terminális régiója gátolja a GEF aktivitást, azaz egy konformációváltozás szükséges az aktív centrum szabaddá válásához (Zhang és McCormick 2007). A PRK és KPP molekulák C-terminális régiója közötti közvetlen kapcsolatot ugyan sikerült igazolni *in vitro* és *in vivo* egyaránt, azt azonban nem, hogy a kináz foszforilációval befolyásolná a KPP funkcióját, annak ellenére, hogy a KPP molekula S510D foszfomimetikus (szerin helyett aszparaginsav) mutációja a KPP molekulát hasonlóképpen aktiválja, mint a C-terminális régió eltávolítása (Zhang és McCormick 2007). Ugyanakkor azt is kimutatták, hogy a KPP fehérje N-terminális régiója is szükséges az *in vivo* aktivitáshoz (Zhang és McCormick 2007). Laboratóriumunkban Antje Berken munkacsoportjával

(Max Planck Molekuláris Fiziológiai Intézet, Dortmund, Németország) együttműködve kísérletesen igazoltuk, hogy a paradicsom PRK1 és 2 kinázok enzimatikusan aktív citoplazmatikus doménje a KPP N-terminális részét és PRONE doménjét is képes *in vitro* foszforilálni, de a C-terminális régiót nem. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a C-terminálison elhelyezkedő S510 aminosavat egy másik kináz foszforilálja, ez a foszforiláció elősegítheti a PRK-KPP kapcsolat kialakulását, ami pedig N-terminális foszforiláción és/vagy konformációváltozáson keresztül a KPP enzimátikus aktivitását eredményezi. Ennek a hipotézisnek az igazolása és a növényi receptor komplexek fehérje-összetételének a vizsgálata szintén érdeklődési körünk homloklterében áll jelenleg. Feltételezzük ugyanis, hogy a receptor kinázok (RLK-k) és a ROP jelátviteli hálózatok közötti kapcsolat, melyben a ROPGEF-ek a közvetítő molekulák, sokkal általánosabb, mint korábban gondoltuk. Az utóbbi időben megjelent számos közlemény alátámasztja ezt a feltételezést (Zou et al. 2011; Duan et al. 2010; Chen et al. 2011; Akamatsu et al. 2013).

A ROP-ok kikapcsolása

A ROP GTPázok jelátviteli aktivitása időben és térben pontosan szabályozott kell legyen. Az állandóan aktív mutáns ROP GTPázok a növényi morfogenezist megzavarják, a sejtek normális alakjának, polaritásának az elvesztésével, védekezési útvonalak, génexpressziós mintázatok állandósult aktiválásával járnak. Éppen ezért a ROP GTPázok inaktíválása is szabályozásuk fontos területe. Mivel azonban ezt a területet saját kutatásaink jelenleg közvetlenül nem érintik, ezért erről itt csak egy rövid áttekintést adok.

A ROP fehérjék a kötött GTP-t képesek GDP-vé hidrolizálni, azonban ez a folyamat rendkívül lassú. Éppen ezért a RHO fehérjék, így a ROP-ok GTP hidrolízisét, és ezzel jelátviteli inaktíválását a GAP (GTPase accelerator/activator protein) fehérjék serkentik. Maga a molekuláris folyamat evolúciósan konzervált, a lényege, hogy a GAP fehérje egy ún. arginin ujjá a GTPáz aktív centrumába hatolva semlegesíti a GTP hidrolízis során keletkező negatív töltést, és ezzel stabilizálja az átmeneti állapotot, illetve elősegíti a hidrolízist végző vízmolekula megfelelő pozicionálását is (Bos et al. 2007). Ugyanakkor a növényi GAP molekuláknak is van egy sajátos vonása. Legtöbbjük rendelkezik egy ún. CRIB (Cdc42/Rac interactive binding) motívummal (Schaefer et al. 2011). Ez a motívum állati és élesztősejtekben kizárólag CDC42 és RAC GTPázok effektor fehérjéiben fordul elő, GAP fehérjéikben nem, és szükséges, de nem elégséges ezeknek az effektoroknak a CDC42/RAC fehérjékhez való kötődéséhez (Cotteret és Chernoff 2002). A CRIB motívum lényegesen megnöveli a ROP és GAP molekulák közötti kötés erősségét, és biztosítja a GAP számára a specificitást. Az egyes GAP molekulák CRIB motívuma eltérő, így befolyásolja, hogy a fehérje mely ROP GTPázokat köti nagyobb affinitással. Vannak azonban a növényekben CRIB motívumot nem tartalmazó ROP GAP molekulák is. Ezek a CRIB motívum helyett PH és csavart csavar („coiled-coil”) szerkezeti motívumokkal rendelkeznek, és szintén hatékony negatív regulátorai a ROP GTPázoknak *in vivo* (Hwang et al. 2008).

A növényi ROP GAP fehérjéknek a szerepét kimutatták a poláris sejtnövekedésben (a csúcsi részre korlátozza a ROP-ok aktivitását) és az alacsony oxigénkoncentrációra (hypoxia), valamint kórokozó-fertőzésre adott válaszreakciókban (Klahre és Kost 2006; Huesmann et al. 2011; Baxter-Burrell 2007).

A RHO G-fehérjék a sejtmembránokhoz kötődve aktiválódnak, aktív formában ezen belül is csak meghatározott membrán doménekhez kapcsolódnak, amiben poszttranszlációs lipid módosításuk játszanak szerepet (Williams 2003). Ezzel szemben az inaktív formáik a citoplazmába kerülnek, amit a GDI fehérjékkel való kapcsolat szabályoz (Dermardirossian és Bokoch 2005). Így a GDI fehérjék a membrán-kötött aktív és citoplazmatikus inaktív ROP formák arányán keresztül befolyásolják a ROP-ok jelátviteli aktivitását. Ennek jelentőségét kimutatták a gyökérszőrök és a pollencső poláris növekedésének szabályozásában is (Carol et al. 2005; Klahre és Kost 2006). A növényi és állati RHO GDI fehérjék szerkezete rendkívül hasonló, így feltehetően hatásmódjuk és funkciójuk is evolúciós konzervációt mutat.

A ROP GTPázok effektorai

A RHO GTPáz effektorok összehasonlítása

A RHO-családba tartozó fehérjék változatos funkcióikat változatos effektor fehérjékhez kapcsolódva fejtik ki (Aspenström 1999). Az eukarióta RHO típusú fehérjék szerkezeti (lásd 1. ábra) és funkcionális eltéréseik alapján több alcsaládba sorolhatóak. Míg élesztőben és állatokban a RHO és CDC42 alcsaládok, illetve utóbbiakban ezeken túl a RAC alcsalád tagjai fordulnak elő, addig növényekben egyetlen, az állati RAC fehérjékhez közel álló, de azoktól jellegzetesen elkülönülő alcsalád, a ROP/RAC G-fehérjék családja van jelen (Vernoud et al., 2003). Az egyes alcsaládok közötti szerkezeti különbségek már előrevetítik a kölcsönható fehérjékben megnyilvánuló eltéréseket is (Nagawa et al. 2010). Amennyiben összevetjük az élesztő, állati és növényi RHO GTPázok effektor fehérjéinek listáját (1. táblázat), azt láthatjuk, hogy a növények számos speciális, csak rájuk jellemző effektorral rendelkeznek, ugyanakkor számos az élesztőben és/vagy az állatokban leírt RHO-effektor a növényekből teljesen hiányzik (Cotteret és Chernoff 2002). Amennyiben a hasonlóságokat akarjuk kiemelni, akkor meg kell említeni az aktin polimerizáció szabályozásában részt vevő WASP/WAVE fehérjéket, amelyek mindhárom csoportban szerepelnek RHO-effektorokként. Ugyanakkor pl. a szintén a citoszkeleton átrendeződésben szerepet játszó forminok, bár a család tagjai jelen vannak növényekben, nem effektorai a ROP GTPázoknak. Ezzel szemben a NADPH oxidáz típusú enzimek effektorai mind az állati, mind a növényi RHO-típusú GTPázoknak, míg élesztőben ilyen kapcsolat nem ismert. A lipidmódosító enzimek (elsősorban kinázok) mindhárom élőlénycsoportra jellemzőek, de arról, hogy közvetlen RHO szabályozás alatt állnak, elsősorban csak állati sejtekből vannak adataink.

1. táblázat. Különböző funkcionális csoportba tartozó RHO GTPáz effektor fehérjék megléte (+) az élesztő, állati, illetve növényi szervezetekben. (CRIB – CDC42/RAC-kötő motívum; RIP – ROP-kötő motívum). A növény-specifikus effektorokat szürke háttérrel kiemeltük

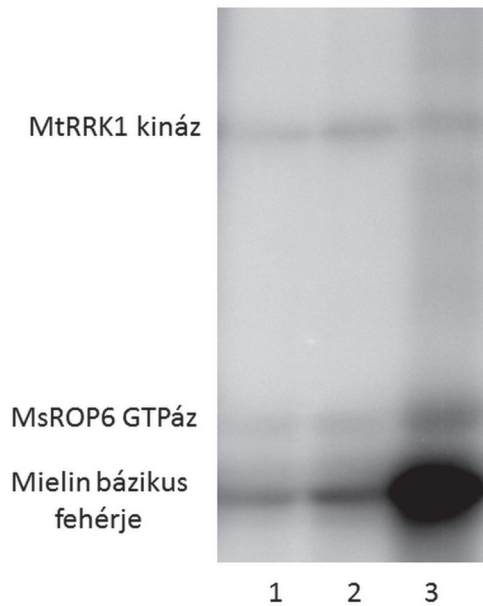
		Név (angol)	RHO-kötő motívum	Élesztő	Állat	Növény	
Nem enzim fehérjék	Scaffold fehérjék, aktin- vagy mikrotubulus-kötő fehérjék	Formin		+	+	?	
		Par6	CRIB		+		
		SPEC	CRIB		+		
		CIP4			+		
		IQGAP		+	+		
		WASP/WAVE	CRIB	+	+	+	
		P140 ^{Sra1}			+		
		POR1			+		
		POSH			+		
		Borg	CRIB			+	
		RIC	CRIB				+
		ICR/RIP	RIP				+
		RACK1A				+	
Enzimek	Egyéb enzimek	NADPH oxidase		?	+	+	
		CCR1				+	
		UGT					+
	Kinázok	PAK	CRIB	+	+		
		ACK	CRIB		+		
		MRCK	CRIB		+		
		MLK	CRIB		+		
		MEKK	CRIB	?	+		
		p70 ^{S6K}				+	?
			RLCK VI_A				+
	Lipid módosítók	PI5K			?	+	?
		PI3K			?	+	?
		Synaptojanin-2			?	+	
		DAG kinase			?	+	?
		PLD			?	+	?

A legjellegzetesebb RHO effektorok, amelyek növényekből hiányoznak, a CRIB motívummal rendelkező CDC42/RAC fehérjék által aktivált kinázok (p21-aktivált vagy PAK kinázok), illetve általánosságban az ismert RHO GTPáz-aktivált kinázok (Zhao és Manser 2005). Ezek az élesztő- és állati sejtekben a RHO GTPázok nagyon fontos jelátviteli partnerei szerteágazó funkciókkal (Bokoch 2003). Hiányuk a növényekben ezért eléggé meglepő. Ezzel szemben a növények rendelkeznek olyan specifi-

kus effektorokkal, melyek csak rájuk jellemzőek. Ilyenek egyes, a sejtfelszintézisben szerepet játszó enzimek (Kawasaki et al. 2005; Hong et al. 2001) és több kisméretű scaffold fehérje (Wu et al. 2001; Li et al. 2008; Wamaita et al. 2012). Ez utóbbiak más fehérjékhez, fehérje komplexekhez való közvetett kapcsolódást biztosítanak a ROP GTPázok számára. Ezek közül az egyik csoportba (RIC, mint „ROP-interacting CRIB-containing proteins”) olyan fehérjék tartoznak, melyek az evolúciósan konzervált CDC42/RAC-kötő CRIB domént tartalmazzák (Wu et al. 2001), míg egy másik csoport (RIP vagy ICR, mint „ROP-interacting protein”, illetve „Interactor of constitutively active ROP”) tagjai viszont egy csak rájuk jellemző ROP-kötő motívumot hordoznak (Bloch et al. 2008). Ezeknek a fehérjéknek számos ROP-közvetített jelátvitelben kimutatták az alapvető és specifikus szerepét, azonban kölcsönható partnereik nem, illetve alig ismertek (Craddock et al. 2012). Felvetődik a kérdés, hogy ha a növényekben hiányoznak a CRIB motívumot hordozó kinázok, de vannak az ezt a motívumot tartalmazó kisméretű scaffold fehérjék, akkor történhet-e ROP-ok általi kináz aktiválás a RIC fehérjéken keresztül. Erre ma még nem tudjuk a választ, ugyanakkor kutatócsoportunk igazolta, hogy növényekben is vannak olyan kinázok, melyeket a GTP-kötött ROP G-fehérjék közvetlenül aktiválhatnak.

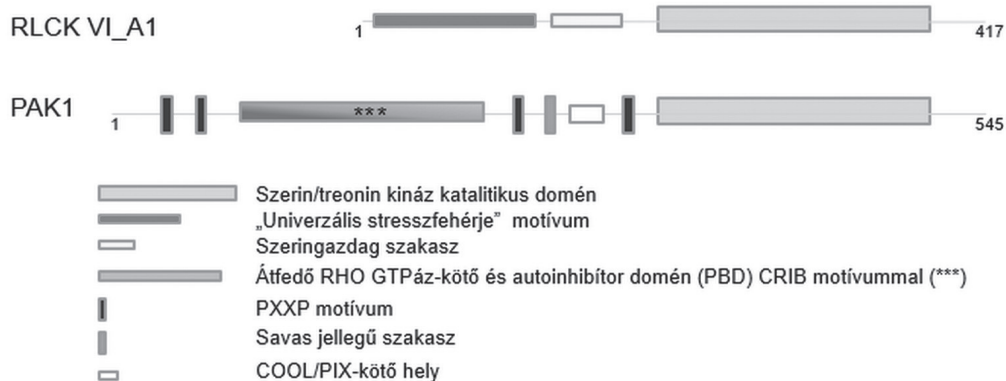
Ezt a felfedezést egy klasszikus élesztő két-hibrid módszerrel történt cDNS bank szűrés eredményezte. Ebben a kísérletben olyan fehérjéket kerestünk, melyek specifikusan állnak kölcsönhatásban a konstitutívan aktív lucerna (*Medicago sativa*) ROP6 GTP-kötő fehérjével (Dorjgotov et al. 2009). A szűrés öt erős CA MsROP6 kölcsönható partner azonosítását eredményezte. Ezek az alábbi fehérjék voltak: egy akkor ismeretlen funkciójú, mai ismereteink szerint gamma-tubulin kölcsönható fehérje, két akkor még szintén ismeretlen funkciójú a RIP/ICR családba tartozó scaffold fehérje, és két kináz fehérje. Mivel a növényekben nincsenek RHO-aktivált (pl. PAK) kinázok (lásd fentebb), érdeklődésünk ez utóbbi két fehérje felé fordult. További kísérletekkel igazoltuk a kölcsönhatások specificitását, azaz azt, hogy a kinázok preferenciálisan a GTP-kötött ROP formával állnak kölcsönhatásban, ahogy az egy effektor kináztól elvárható, és hogy ez a kötés *in vitro* és *in vivo* is megvalósul. Ezt követően vizsgáltuk a tisztított kináz fehérjék *in vitro* aktivitását, és megállapítottuk, hogy az függ a GTP-kötött ROP forma jelenlététől, azaz ezek a kinázok ebből a szempontból is megfelelnek a ROP effektor kinázokkal szemben támasztott kritériumoknak (5. ábra; Dorjgotov et al. 2009). A kinázok elsődleges szerkezetének analízise alapján megállapítottuk, hogy a kinázok a csak növényekben megtalálható, receptorszerű citoplazmatikus kinázok (RLCK) közé tartoznak, mégpedig azoknak is a VI. számmal jelölt családjába. A ROP-RLCK VI potenciális jelátviteli kapcsolat növényekre jellemző általános jellegét azzal igazoltuk, hogy a lucerna és *Arabidopsis* fehérjéken túl egy homológ árpa RLCK VI fehérje esetében is bizonyítottuk a kináz *in vitro* aktivitásának aktív ROP GTPáz függését (Huesmann et al. 2012).

Arabidopsis-ban az RLCK VI család 14 tagot számlál, melyek két csoportba oszthatók (A, B) (Jurca et al. 2008). Élesztő két-hibrid mátrix kísérletben kimutattuk, hogy csak az A csoport tagjai kötődnek az aktív ROP GTPázokhoz (Dorjgotov et al. 2009). A szekvenciavizsgálat megerősítette, hogy sem az A sem a B csoportba tartozó kiná-



5. ábra. Az MtRRK1 kináz *in vitro* aktivitása a GTP-kötött ROP6 Gtáz jelenlététől függ. *In vitro* kinázaktivitás detektálása fehérje poliakrilamid gélelektroforézist követően. Az MtRRK1 kináz megfelelő kináz pufferben radioaktív $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP jelenlétében inkubáltuk sertés mielin bázikus fehérjével mint általános szerin/treonin kináz szubsztráttal különböző ROP6 GTPáz formák (1. vad típus, 2. GDP-kötött konformációt imitáló T20N mutáns forma, 3. GTP-kötött konformációt imitáló G15V mutáns forma) jelenlétében. A reakcióelegyet gélelektroforézissel szétválasztottuk és autoradiografáltuk. A fehérjék pozícióját a gél mellett jelöljük. A sötét folt a szubsztrát radioaktív foszforral való jelölődését, azaz a kináz aktivitását jelzi

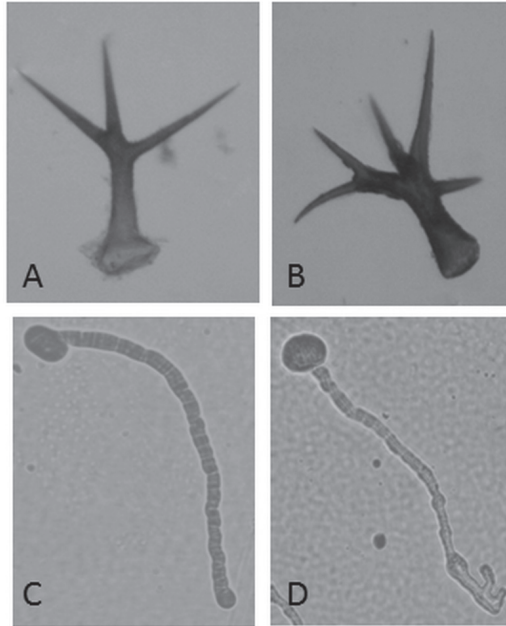
zok nem rendelkeznek semmilyen ismert G-fehérje kötő (pl. CRIB) motívummal, és feltehetően egy új típusú G-fehérje-kináz kapcsolattal lehet dolgunk. Az A és B csoportba tartozó RLCK VI kinázok szekvencia-összehasonlítása azonban segített abban, hogy azonosítsunk olyan jellegzetes szekvenciakülönbségeket, melyek szerepet játszhatnak a G-fehérjékkel való kapcsolatban és a kinázaktivitás szabályozásában. Érdekes módon, bár ezek a különbségek a fehérje különböző régióit érintik, egy háromdimenziós szerkezeti modell alapján a fehérje felszínén egymáshoz nagyon közel helyezkednek el, azaz sikerült azonosítanunk egy potenciális ROP-kötő felszínt az RLCK VI_A kináz fehérjéken. Ezt a feltételezést a megfelelő aminosavakat érintő mutációk vizsgálatával igazoltuk (nem közölt adatok). Mindezek ellenére, az RLCK VI_A kinázok ROP GTPázok általi aktivációjának mechanizmusa továbbra is rejtély. A PAK kinázok esetében ismert, hogy az enzimatikusan aktív doménjük mellett rendelkeznek egy N-terminális inhibitor doménnel, ami tartalmazza a G-fehérje kötő domént (PBD) a CRIB motívummal (6. ábra). Normál esetben ez az inhibitor domén gátolja a kináz aktivitását. A G-fehérje kötődése a PBD-hez konformációváltozást okoz,



6. ábra. A növényi (*Arabidopsis* RLCK VI_A1) és állati (humán PAK1) RHO GTPáz által aktivált kinázok szerkezetének vázlatos összehasonlítása. Az állati fehérje jellegzetes autoinhibitor doménje a RHO GTPáz-kötő PBD régióval, illetve CRIB motívummal hiányzik a növényi fehérjékből. A növényi fehérjében megfigyelhető „univerzális stresszfehérje”, illetve szeringazdag motívumok funkciója nem ismert

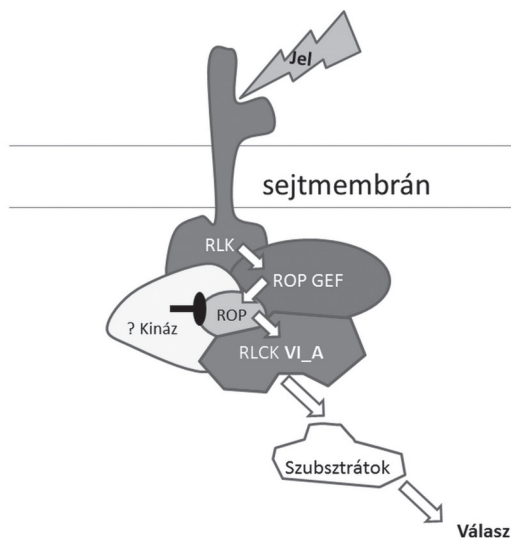
ami felszabadítja a kináz domént a gátlás alól (Bagrodia és Cerione 1999). Egy újabb poszttranszlációs módosítás (általában foszforiláció) stabilizálja ezt a konformációt, így a G-fehérje az aktív kinázzal leválva újabb kinázzal aktiválható. Nyilvánvalóan ez a mechanizmus a sem PBD domént (CRIB motívumot), sem inhibitor régiót nem tartalmazó RLCK VI_A kinázok esetében nem működhet (6. ábra). A ROP-mediált RLCK VI_A kináz aktiválás mechanizmusának a feltárása még a jövő feladata.

Bár az RLCK VI_A kinázok *in vitro* megállapított biokémiai jellegzetességeik alapján ROP-effektor kinázoknak tekinthetők, az igazi bizonyítékot az szolgáltatja, ha *in planta* is igazolódik, hogy ROP GTP-szabályozott folyamatokban vesznek részt a G-fehérje által szabályozott módon. Ehhez létrehoztunk olyan transzgenikus *Arabidopsis* növényeket, melyek egyes RLCK VI_A kinázokat indukálható módon túl- vagy alultermelnek. Bár ezek a kísérletek még nem záródtak le, azt megállapíthattuk, hogy a vizsgált kinázok szintjének megváltoztatása, ektopikus túltermelése, illetve génjeik kikapcsolása olyan folyamatokban okozott zavart, mint a levélszőr-morfogenezis illetve pollencső-növekedés (7. ábra), melyek közismerten ROP-GTPáz aktivitás függő folyamatok. További bizonyítékot szolgáltatott az RLCK VI kinázok és ROP GTPázok *in vivo* kapcsolatára azok a kísérletek, melyeket prof. Ralph Hüchelhoven laboratóriumával (Müncheni Műszaki Egyetem) együttműködve folytattunk lisztharmattal fertőzött árpaleveleken (Huesmann et al. 2012). Hüchelhoven professzor és munkatársai az árpa epidermiszsejtek lisztharmatfertőzését vizsgálva megállapították, hogy a folyamatban az árpa RACB GTPáz fontos szerepet játszik (Opalski et al. 2005; Schultheiss et al. 2002; 2003). A gomba hausztóriumképződése ugyanis alapvetően nem más, mint poláris sejtnövekedés, ami azonban nem kifelé, hanem a sejt belseje felé irányul. Ezt a



7. ábra. Az RLCK VI_A kinázok expressziójának megváltoztatása megzavarja a sejtpolaritás kialakulását. *Arabidopsis* levélszőrök normális esetben leginkább három elágazódással rendelkeznek (A), az egyik RLCK VI_A kináz expresszióját gátolva gyakori a négy és nem ritka az öt elágazódás sem (B). Míg a pollencső normál esetben jól meghatározott egyirányú poláris növekedést mutat (C), addig az egyik RLCK VI_A kináz expresszióját gátolva gyakran megfigyelhető a pollencső elágazódása (D)

gomba úgy éri el, hogy valamilyen, még ismeretlen módon, lokálisan aktiválja a RACB GTPáz, ami kiváltja a membránbefűződést és a hausztórium kialakulását. Ezt a folyamatot az aktív RACB GTPáz túltermeltetése serkenti, a GTPáz génjének kikapcsolása megakadályozza. Azt is kimutatták, hogy a mikrotubulus-hálózat átrendeződésével kapcsolatos (a hausztóriumképződés helyénél a mikrotubulus-hálózat fellazul) folyamatban az aktív RACB és negatív regulátora, a MAGAP1 fehérje ellentétes szerepet játszanak (Hoefle et al. 2011; Huesmann et al. 2011). Ezt a folyamatot a RACB által aktivált RLCK VI_A családba tartozó RBK1 kináz is befolyásolja (Huesmann et al. 2012). Érdekes módon azonban kísérleteink azt igazolták, hogy az RBK1 kináz génjének átmeneti csendesítése a gombafertőzést elősegíti, ami ellentmond annak a kísérleti ténynek, miszerint az őt aktiváló GTP-kötött RACB hiánya a fertőzést gátolja (lásd fentebb). Ennek a magyarázata lehet egy negatív visszacsatolási szabályozás, miszerint az RBK1 kináz a RACB-nek nemcsak effektora, de egyben negatív regulátora is. Az is lehetséges azonban, hogy a sejtekben az RBK1 kináz aktivátora nem a RACB fehérje, hanem egy másik, a védekezési folyamatokat aktiváló RAC GTPáz, amelyen például a RAC1 (lásd fentebb a rizs RAC1 szerepét a kórokozókkal szembeni védekezésben). Bár ez a kérdés még további vizsgálatokat igényel, az eredmények tovább erősítik azt a nézetet, hogy



8. ábra. A növényi ROP GTPázok kapcsolódása receptor, szabályozó, illetve effektor kinázokhoz jelenlegi ismereteink szerint. A receptorszerű kinázok (RLK) extracelluláris jelfelfogó doménje érzékeli az adott szignált, aminek hatására az intracelluláris kináz domén aktiválódik, és még ismeretlen módon, de feltehetően N-terminális foszforiláció révén, aktiválja a ROPGEF fehérjét. A ROPGEF fehérje elősegítve a GDP-GTP cserét aktiválja a ROP GTPázt, amely GTP-kötött formában köti és aktiválja az RLCK VI_A típusú effektor kinázt. Egy jelenleg ismeretlen kináz a ROP GTPáz 74. szerincsoportját foszforilálva gátolhatja a ROP GEF-ROP kölcsönhatást, ezzel blokkolva a ROP GTPáz jelátviteli aktiválását

mivel az RLCK VI_A kinázok és ROP GTPázok együtt vesznek részt több növényi életfolyamatban, és mivel a kinázok *in vitro* aktivitása és sejten belüli elhelyezkedése aktív ROP GTPáz függő, ezek a kinázok ROP effektor kinázoknak tekinthetőek (8. ábra).

Felhasznált irodalom

- Agrawal, G.–Iwahashi, H.–Rakwal, R. (2003) Small GTPase “ROP”: molecular switch for plant defense responses. *FEBS Lett* 546: 173–180.
- Akamatsu, A.–Wong, H. L.–Fujiwara, M.–Okuda, J.–Nishide, K.–Uno, K.–Imai, K.–Umemura, K.–Kawasaki, T.–Kawano, Y.–Shimamoto, K. (2013) An OsCEBiP/OsCERK1-OsRacGEF1-OsRac1 Module Is an Essential Early Component of Chitin-Induced Rice Immunity. *Cell Host Microbe* 13: 465–476.
- Asaad, F. F. (2001) Of weeds and men: what genomes teach us about plant cell biology. *Curr Opin Plant Biol* 2: 478–487.
- Aspenström, P. (1999) Effectors for the rho GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 95–102.
- Bagrodia, S.–Cerione, R. A. (1999) PAK to the future. *Trends Cell Biol* 9: 350–355.

- Basu, D.–Le, J.–Zakharova, T.–Mallery, E. L.–Szymanski, D. B. (2008) A SPIKE1 signaling complex controls actin-dependent cell morphogenesis through the heteromeric WAVE and ARP2/3 complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 4044–4049.
- Baxter-Burrell, A. (2007) RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of Arabidopsis oxygen deprivation tolerance. *Science* 296: 2026–2028.
- Berken, A. (2006) ROPs in the spotlight of plant signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 63: 2446–2459.
- Berken, A.–Thomas, C.–Wittinghofer, A. (2005) A new family of RhoGEFs activates the rop molecular switch in plants. *Nature* 436: 1176–1180.
- Berken, A.–Wittinghofer, A. (2008) Structure and function of Rho-type molecular switches in plants. *Plant Physiol Biochem* 46: 380–393.
- Bloch, D.–Hazak, O.–Lavy, M.–Yalovsky, S. (2008) A novel ROP/RAC GTPase effector integrates plant cell form and pattern formation. *Plant Signal Behav* 3: 41–43.
- Bokoch, G. M. (2003) Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72: 743–781.
- Bos, J.–Rehmann, H.–Wittinghofer, A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 865–877.
- Brembu, T.–Winge, P.–Bones, A. M.–Yang, Z. (2006) A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases. *Cell Res* 16: 435–445.
- Brugnera, E.–Haney, L.–Grimsley, C.–Lu, M.–Walk, S. F.–Tosello-Tramont, A.–C.–Macara, I. G.–Madhani, H.–Fink, G. R.–Ravichandran, K. S. (2002) Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4: 574–582.
- Carol, R. J.–Takeda, S.–Linstead, P.–Durrant, M. C.–Kakesova, H.–Derbyshire, P.–Drea, S.–Zarsky, V.–Dolan, L. (2005) A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature* 438: 1013–1016.
- Chen, L.–Shiotani, K.–Togashi, T.–Miki, D.–Aoyama, M.–Wong, H. L.–Kawasaki, T.–Shimamoto, K. (2010) Analysis of the Rac/Rop small GTPase family in rice: expression, subcellular localization and role in disease resistance. *Plant Cell Physiol* 51: 585–595.
- Chen, M.–Liu, H.–Kong, J.–Yang, Y.–Zhang, N.–Li, R.–Yue, J.–Huang, J.–Li, C.–Cheung, A. Y.–Tao, L.–Z. (2011) RopGEF7 Regulates PLETHORA-Dependent Maintenance of the Root Stem Cell Niche in Arabidopsis. *Plant Cell* 23: 2880–2894.
- Cotteret, S.–Chernoff, J. (2002) The evolutionary history of effectors downstream of Cdc42 and Rac. *Genome Biol* 3: reviews0002.1–0002.8.
- Craddock, C.–Lavagi, I.–Yang, Z. (2012) New insights into Rho signaling from plant ROP/Rac GTPases. *Trends Cell Biol* 22: 492–501.
- Craddock, C.–Yang, Z. (2012) Endocytic signaling in leaves and roots: same rules different players. *Front Plant Sci* 3: 219.
- Dermardirossian, C.–Bokoch, G. (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15: 356–363.
- Dorjgotov, D.–Jurca, M. E.–Fodor-Dunai, C.–Szűcs, A.–Ötvös, K.–Klement, É.–Bíró, J.–Fehér, A. (2009) Plant Rho-type (Rop) GTPase-dependent activation of receptor-like cytoplasmic kinases in vitro. *FEBS Lett* 583: 1175–1182.

- Duan, Q.–Kita, D.–Li, C.–Cheung, A. Y.–Wu, H.–M. (2010) FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 17821–17826.
- Dvorsky, R.–Ahmadian, M. R. (2004) Always look on the bright site of Rho: structural implications for a conserved intermolecular interface. *EMBO Rep* 5: 1130–1136.
- Fauré, J.–Dagher, M. C. (2001) Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie* 83: 409–14.
- Fehér, A.–Jurca, M. E.–Fodor-Dunai, C.–Dorjgotov, D. (2008) Regulation of ROP GTPase signalling at the gene expression level: A review. *Open Plant Sci J* 2: 21–30.
- Fletcher, J. C.–Meyerowitz, E. M. (2000) Cell signaling within the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol* 3: 23–30.
- Fodor-Dunai, C.–Fricke, I.–Potocký, M.–Dorjgotov, D.–Domoki, M.–Jurca, M. E.–Otvös, K.–Zárský, V.–Berken, A.–Fehér, A. (2011) The phosphomimetic mutation of an evolutionarily conserved serine residue affects the signaling properties of Rho of plants (ROPs). *Plant J* 66: 669–79.
- Fricke, I.–Berken, A. (2009) Molecular basis for the substrate specificity of plant guanine nucleotide exchange factors for ROP. *FEBS Lett* 583: 75–80.
- Geyer, M.–Wittinghofer, A. (1997) GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7: 786–92.
- Gu, Y.–Fu, Y.–Dowd, P.–Li, S.–Vernoud, V.–Gilroy, S.–Yang, Z. (2005) A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol* 169: 127–138.
- Gu, Y.–Li, S.–Lord, E. M.–Yang, Z. (2006) Members of a novel class of Arabidopsis Rho guanine nucleotide exchange factors control Rho GTPase-dependent polar growth. *Plant Cell* 18: 366–381.
- Hall, A.–Etienne-Manneville, S. (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: 629–635.
- Hoefle, C.–Huesmann, C.–Schultheiss, H.–Börnke, F.–Hensel, G.–Kumlehn, J.–Hückelhoven, R. (2011) A Barley ROP GTPase ACTIVATING PROTEIN associates with microtubules and regulates entry of the barley powdery mildew fungus into leaf epidermal cells. *Plant Cell* 23: 1–19.
- Hong, Z.–Zhang, Z.–Olson, J. M.–Verma DPS (2001) A novel UDP-glucose transferase is part of the callose synthase complex and interacts with phragmoplastin at the forming cell plate. *Plant Cell* 13: 769–779.
- Huesmann, C.–Hoefle, C.–Hückelhoven, R. (2011) ROPGAPs of Arabidopsis limit susceptibility to powdery mildew. *Plant Signal Behav* 6: 0–1.
- Huesmann, C.–Reiner, T.–Hoefle, C.–Preuss, J.–Jurca, M. E.–Domoki, M.–Fehér, A.–Hückelhoven, R. (2012) Barley ROP binding kinase1 is involved in microtubule organization and in basal penetration resistance to the barley powdery mildew fungus. *Plant Physiol* 159: 311–20.
- Hwang, J.–Vernoud, V.–Szumlanski, A. (2008) A tip-localized RhoGAP controls cell polarity by globally inhibiting Rho GTPase at the cell apex. *Curr Biol* 18: 1907–1916.
- Hwang J-U.–Gu, Y.–Lee, Y-J.–Yang, Z. (2005) Oscillatory ROP GTPase activation leads the oscillatory polarized growth of pollen tubes. *Mol Biol Cell* 16: 5385–5399.

- Hwang, J.-U.,–Jeon, B. W.–Hong, D.–Lee, Y. (2011) Active ROP2 GTPase inhibits ABA- and CO₂-induced stomatal closure. *Plant Cell Environ* 34: 2172–82.
- Jurca, M. E.–Bottka, S.–Fehér, A. (2008) Characterization of a family of Arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinases (RLCK class VI). *Plant Cell Rep* 27: 739–48.
- Kaothien, P.–Ok, S. H.–Shuai, B.–Wengier, D.–Cotter, R.–Kelley, D.–Kiriakopolos, S.–Muschiatti, J.–McCormick, S. (2005) Kinase partner protein interacts with the LePRK1 and LePRK2 receptor kinases and plays a role in polarized pollen tube growth. *Plant J* 42: 492–503.
- Karnoub, A. E.–Symons, M.–Campbell, S. L.–Der, C. J. (2004) Molecular basis for Rho GTPase signaling specificity. *Breast Cancer Res Treat* 84: 61–71.
- Kawano, Y.–Akamatsu, A.–Hayashi, K.–Housen, Y.–Okuda, J.–Yao, A.–Nakashima, A.–Takahashi, H.–Yoshida, H.–Wong, H. L.–Kawasaki, T.–Shimamoto, K. (2010a) Activation of a Rac GTPase by the NLR family disease resistance protein Pit plays a critical role in rice innate immunity. *Cell Host Microbe* 7: 362–375.
- Kawano, Y.–Chen, L.–Shimamoto, K. (2010b) The function of Rac small GTPase and associated proteins in rice innate immunity. *Rice* 3: 112–121.
- Kawasaki, T.–Henmi, K.–Ono, E.–Hatakeyama, S.–Iwano, M.–Satoh, H.–Shimamoto, K. (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10922–10926.
- Kawasaki, T.–Koita, H.–Nakatsubo, T.–Hasegawa, K.–Wakabayashi, K.–Takahashi, H.–Umemura, K.–Umezawa, T.–Shimamoto, K. (2005) Cinnamoyl-CoA reductase, a key enzyme in lignin biosynthesis, is an effector of small GTPase Rac in defense signaling in rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 230–235.
- Kim, S.-H.–Oikawa, T.–Kyojuka, J.–Wong, H. L.–Umemura, K.–Kishi-Kaboshi, M.–Takahashi, A.–Kawano, Y.–Kawasaki, T.–Shimamoto, K. (2012) The bHLH Rac Immunity1 (RAI1) is activated by OsRac1 via OsMAPK3 and OsMAPK6 in rice immunity. *Plant Cell Physiol* 53: 740–54.
- Klahre, U.–Kost, B. (2006) Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes. *Plant Cell* 18: 3033–3046.
- Kwon, T.–Kwon, D. Y.–Chun, J.–Kim, J. H.–Kang, S. S. (2000) Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem* 275: 423–428.
- Lavy, M.–Bloch, D.–Hazak, O.–Gutman, I.–Poraty, L.–Sorek, N.–Sternberg, H.–Yalovsky, S. (2007) A novel ROP/RAC effector links cell polarity, root-meristem maintenance, and vesicle trafficking. *Curr Biol* 17: 947–952.
- Lemichez, E.–Wu, Y.–Sanchez, J. P.–Mettouchi, A.–Mathur, J.–Chua, N. H. (2001) Inactivation of AtRac1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes Dev* 15: 1808–1816.
- Li, S.–Gu, Y.–Yan, A.–Lord, E.–Yang, Z.-B. (2008) RIP1 (ROP Interactive Partner 1)/ICR1 marks pollen germination sites and may act in the ROP1 pathway in the control of polarized pollen growth. *Mol Plant* 1: 1021–1035.
- Macara, I. G.–Lounsbury, K. M.–Richards, S. A.–McKiernan, C.–Bar-Sagi, D. (1996) The Ras superfamily of GTPases. *FASEB J* 10: 625–630.
- Meller, N. (2005) CZH proteins: a new family of Rho-GEFs. *J Cell Sci* 118: 4937–4946.
- Mucha, E.–Fricke, I.–Schaefer, A.–Wittinghofer, A.–Berken, A. (2011) Rho proteins of plants – Functional cycle and regulation of cytoskeletal dynamics. *Eur J Cell Biol* 90: 934–943.

- Nagawa, S.–Xu, T.–Lin, D.–Dhonukshe, P.–Zhang, X.–Friml, J.–Scheres, B.–Fu, Y.–Yang, Z. (2012) ROP GTPase-dependent actin microfilaments promote PIN1 polarization by localized inhibition of clathrin-dependent endocytosis. *PLoS Biol* 10: e1001299.
- Nagawa, S.–Xu, T.–Yang, Z. (2010) RHO GTPase in plants: Conservation and invention of regulators and effectors. *Small GTPases* 1: 78–88.
- Nibau, C.–Wu, H.–Cheung, A. (2006) Rac/Rop GTPases: “hubs” for signal integration and diversification in plants. *Trends Plant Sci* 11: 309–315.
- Oda, Y.–Fukuda, H. (2012) Initiation of cell wall pattern by a Rho- and microtubule-driven symmetry breaking. *Science* 337: 1333–1336.
- Opalski, K. S.–Schultheiss, H.–Kogel, K.-H.–Hückelhoven, R. (2005) The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis f. sp. Hordei*. *Plant J* 41: 291–303.
- Qian, P.–Hou, S.–Guo, G. (2009) Molecular mechanisms controlling pavement cell shape in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Rep* 28: 1147–1157.
- Qin, Y.–Yang, Z. (2011) Rapid tip growth: Insights from pollen tubes. *Semin Cell Dev Biol* 1–9.
- Qiu, J.–Jilk, R.–Marks, M. D.–Szymanski, D. B. (2002) The *Arabidopsis* SPIKE1 gene is required for normal cell shape control and tissue development. *Plant Cell* 14: 101–118.
- Rehani, K.–Wang, H.–Garcia, C. A.–Kinane, D. F.–Martin, M. (2009) Toll-like receptor-mediated production of IL-1Ra is negatively regulated by GSK3 via the MAPK ERK1/2. *J Immunol* 182: 547–553.
- Rossmann, K. L.–Der, C. J.–Sondek, J. (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 167–180.
- Schaefer, A.–Miertzschke, M.–Berken, A.–Wittinghofer, A. (2011) Dimeric Plant RhoGAPs Are Regulated by Its CRIB Effector Motif to Stimulate a Sequential GTP Hydrolysis. *J Mol Biol* 411: 808–822.
- Schiller, M. (2006) Coupling receptor tyrosine kinases to Rho GTPases–GEFs what’s the link. *Cell Signal* 18: 1834–1843.
- Schultheiss, H.–Dechert, C.–Kogel, K. H.–Hückelhoven, R. (2002) A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiol* 128: 1447–1454.
- Schultheiss, H.–Dechert, C.–Kogel, K.-H.–Hückelhoven, R. (2003) Functional analysis of barley RAC/ROP G-Protein family members in susceptibility to the powdery mildew fungus. *Plant J* 36: 589–601.
- Shiu, S. H.–Bleecker, A. B. (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE* 2001: re22.
- Sorek, N.–Henis, Y.–Yalovsky, S. (2011) How prenylation and S-acylation regulate subcellular targeting and function of ROP GTPases. *Plant Signal Behav* 6: 1026–1029.
- Tao, L.–Cheung, A. Y.–Nibau, C.–Wu, H. (2005) RAC GTPases in tobacco and *Arabidopsis* mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins. *Plant Cell* 17: 2369–2383.
- Thomas, C.–Fricke, I.–Scrima, A.–Berken, A.–Wittinghofer, A. (2007) Structural evidence for a common intermediate in small G protein-GEF reactions. *Mol Cell* 25: 141–149.

- Vernoud, V.–Horton, A. C.–Yang, Z.–Nielsen, E. (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiol* 131: 1191–1208.
- Wamaita, M. J.–Yamamoto, R.–Wong, H. L.–Kawasaki, T.–Kawano, Y.–Shimamoto, K. (2012) OsRap2.6 transcription factor contributes to rice innate immunity through its interaction with Receptor for Activated Kinase-C 1 (RACK1). *Rice* 5: 35.
- Wennerberg, K.–Rossman, K. L.–Der, C. J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118: 843–846.
- Williams, C. (2003) The polybasic region of Ras and Rho family small GTPases: a regulator of protein interactions and membrane association and a site of nuclear localization signal sequences. *Cell Signal* 15: 1071–1080.
- Wong, H. L.–Sakamoto, T.–Kawasaki, T.–Umemura, K.–Shimamoto, K. (2004) Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiol* 135: 1447–1456.
- Wong, H. L.–Pinontoan, R.–Hayashi, K.–Tabata, R.–Yaeno, T.–Hasegawa, K.–Kojima, C.–Yoshioka, H.–Iba, K.–Kawasaki, T. et al. (2007) Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* 19: 4022–4034.
- Wu, G.–Gu, Y.–Li, S.–Yang, Z. (2001) A genome-wide analysis of Arabidopsis Rop-interactive CRIB motif-containing proteins that act as Rop GTPase targets. *Plant Cell* 13: 2841–2856.
- Xin, Z.–Zhao, Y.–Zheng, Z.-L. (2005) Transcriptome analysis reveals specific modulation of abscisic acid signaling by ROP10 small GTPase in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 1350–1365.
- Xu, J.–Scheres, B. (2005) Cell polarity: ROPing the ends together. *Curr Opin Plant Biol* 8: 613–618.
- Xu, T.–Wen, M.–Nagawa, S.–Fu, Y.–Chen, J.–Wu, M.–Perrot-Rechenmann, C.–Friml, J.–Jones, M.–Yang, Z. (2010) Cell surface-and Rho GTPase-Based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. *Cell* 143: 99–110.
- Yamaguchi, K.–Imai, K.–Akamatsu, A.–Mihashi, M.–Hayashi, N.–Shimamoto, K.–Kawasaki, T. (2012) SWAP70 functions as a Rac/Rop guanine nucleotide-exchange factor in rice. *Plant J* 70: 389–397.
- Yang, Z. (2002) Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell Supplement*: 375–388.
- Zhang, Y.–McCormick, S. (2008) Regulation of pollen tube polarity. *Plant Signal Behav* 3: 345–347.
- Zhang, Y.–McCormick, S. (2007) A distinct mechanism regulating a pollen-specific guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rop in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18830–18835.
- Zhao, Z.–Manser, E. (2005) PAK and other Rho-associated kinases—effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* 386: 201–214.
- Zheng, Z. L.–Nafisi, M.–Tam, A.–Li, H.–Crowell, D. N.–Chary, S. N.–Schroeder, J. I.–Shen, J.–Yang, Z. (2002) Plasma Membrane-Associated ROP10 Small GTPase Is a Specific Negative Regulator of Abscisic Acid Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* 14: 2787–2797.
- Zou, Y.–Aggarwal, M.–Zheng, W.-G.–Wu, H.-M.–Cheung, A. Y. (2011) Receptor-like kinases as surface regulators for RAC/ROP-mediated pollen tube growth and interaction with the pistil. *AoB Plants* 2011: plr017–plr017.

IV. Fehérjeszintézis kémcsőben, avagy az *in vitro* transzláció alkalmazási lehetőségei¹

MÉSZÁROS TAMÁS

Összefoglalás

A proteomikai kutatások gyakori limitáló tényezője a tanulmányozandó fehérje megfelelő mennyiségben és tisztaságban való elérhetősége. A probléma áthidalására a különböző, sejtes alapú fehérjetütermelő rendszerek nyújtják az általános alkalmazott megközelítést. Napjainkra azonban a sejtmentes, *in vitro* transzlációs rendszerekre mint a fehérjetermelés reális alternatíváira tekinthetünk, bizonyos szempontokból pedig előnyösebbek is a hagyományos fehérjeszintetizáló módszereknél. A változatos *in vitro* transzlációs elegyek közül a búzacsírából készült tűnik a legmegfelelőbbnek, mivel jól használható az eukarióta, multidoménos fehérjék effektív, gyors és költséghatékony előállítására. Laboratóriumunk a búzacsíra-kivonatra optimalizált vektor segítségével számos eukarióta fehérjét szintetizált sikeresen, és a termelt fehérjék funkcionálitása is igazolásra került.

Summary

One of the main bottlenecks of proteomics is the availability of pure and ample amount of protein of interest. The generally applied method of choice for fulfilling the protein needs is the cell-based protein overexpression system. However, the cell-free *in vitro* translation systems have been enhanced in the last decade; therefore, they have become a reasonable alternative of traditional protein producing systems. Furthermore, the optimized *in vitro* translation is superior to cell-based protein production in many terms. Though various cell-free protein synthesizing systems have been developed, the wheat germ-based seems to be the most suitable for production of eukaryotic, multidomain proteins. Our laboratory enhanced the available wheat germ-based *in vitro* translation vector and applied for production of various eukaryotic proteins, and success of the synthesis of properly folded proteins were demonstrated by functional studies too.

¹ Hálás vagyok laboratóriumunk minden jelenlegi és volt tagjának, akik nélkül a bemutatott eredmények nem jöttek volna létre. Külön köszönettel tartozom Andrási Juditnak, Bánhegyi Gábornak, Bardóczy Violának, Nagy Szilviának és Németh Csillának, akik közvetlenül is közreműködtek az ismertett kísérletekben.

A múlt század közepéig a biokémiai kutatások döntőrészt a fő metabolikus folyamatok leírását és a fehérjék vizsgálatát jelentették. Ebben a korai időszakban váltak ismertté a sejtek anyagcseréjének háttérben álló kémiai reakciók, és számos fehérje funkciója került igazolásra. Az ötvenes évek elején az első fehérje aminosav-szekvencia, az inzulin elsődleges szerkezete vált ismertté, az évtized végére pedig a röntgenkrisztallográfiás vizsgálatok eredményeként az első fehérje térszerkezeti modell, a mioglobín háromdimenziós szerkezet is nyilvánosságra került. A fehérjekutatások aranykorának a DNS kettős spirál szerkezetének felfedezése, a nukleinsavak jelentőségének felismerése és a centrális dogma leírása vetett végett. Ezen új ismeretek következményeként számos kutató érdeklődése a nukleinsavak felé fordult, az ezredfordulóig következő évek túlnyomóan a molekuláris biológia jegyében teltek el.

A nukleinsav-kutatások és a molekuláris biológia robbanásszerű fejlődésének oka nemcsak a terület vitathatatlan fontosságában keresendő. A jelenség háttérben egy másik, sokkal prózaibb tényező is tetten érhető, nevezetesen a nukleinsavak a fehérjékkel összevetve hálásabb vizsgálati anyagoknak bizonyulnak. A nukleinsavak szerkezetileg nagyon hasonló alapegységekből, nukleotidokból épülnek fel, így kémiai tulajdonságaikra nézve tulajdonképpen homogén mintáknak tekinthetők, minek következtében a nukleinsavak analízisére generálisan alkalmazható metodikák állnak rendelkezésünkre. Ezzel szemben a fehérjéket változatos tulajdonságú aminosavak alkotják, így csak nagy vonalakban beszélhetünk általános kémiai tulajdonságaikról, közelebbről nézve minden fehérje sajátos izoelektromos ponttal, oldhatósággal és térszerkezettel rendelkezik. Ez a kémiai sokszínűség teszi lehetővé, hogy a fehérjék rendkívül különböző funkciókat töltsenek be az élő szervezetekben, az élet szempontjából elengedhetetlen diverzitás kísérletes szemmel nézve azonban hátrányként jelentkezik, mivel némi túlzással kijelenthetjük, hogy minden egyes fehérjevizsgálatot az adott fehérjére alkalmazható protokollok kidolgozása előz meg.

A fehérjék kémiai sokfélesége nem az egyetlen korlátozó tényezője a proteomikai kutatásoknak. Míg a nukleinsavak *in vivo* és *in vitro* módszerekkel, valamint kémiai szintézissel egyaránt előállíthatók, addig a kísérletekhez szükséges mennyiségű és megfelelő tisztaságú fehérje előteremtése számos okból kifolyólag nem rutinfeladat. A tradicionális, a vizsgált élőlényből történő fehérjetisztítási eljárásokat egyedileg kell optimalizálni, ráadásul ezt a megközelítést nagyban korlátozza a kiindulási mintában található fehérje mennyisége is. A napjainkban intenzíven kutatott jelátviteli útvonalakban szerepet játszó fehérjék esetében ez utóbbi probléma különös súllyal jelentkezik, mivel ezen fehérjék a sejtek összfehérje-koncentrációjának csak elenyésző részét adják.

A molekuláris biológia bizonyos tekintetben háttérbe szorította a fehérjekutatásokat, más oldalról azonban hozzájárult a proteomika eszköztárának látványos bővüléséhez is. Ennek a fejlődésnek egyik fontos eleme a rekombináns fehérjéket termelő rendszerek megjelenése. Ez az új megközelítés két szempontból is óriási előrelépést hozott a fehérjék előállításában. Egyrészt megteremtette a fehérjék korlátlan mennyiségben történő szintézisének az elméleti lehetőségét, másrészt drasztikusan leegyszerűsítette a fehérjék tisztítását. A fehérjetermelő rendszerek közös sajátossága,

hogy valamilyen sejt vagy organizmus genetikai állományát az előállítandó fehérje kódoló szekvenciájának bejuttatásával megváltoztatjuk, majd a transzformált sejtek transzkripció és transzláció apparátusát az idegen fehérje szintézisére kényszerítjük. Az ily módon túltermelt fehérjék egyszerű izolálhatóságát általában azáltal biztosítjuk, hogy az eredeti fehérje szekvenciáját affinitáskromatográfiás elválasztásra alkalmas aminosav motívummal egészítjük ki, melynek segítségével a rekombináns fehérje egy lépésben nagymértékben tisztítható. A fehérjetúltermelő rendszerek prokarióta és eukarióta sejtekre optimalizált variánsai egyaránt elérhetőek, alapkutatási és ipari mennyiségű fehérjék előállítására is jól alkalmazhatók.

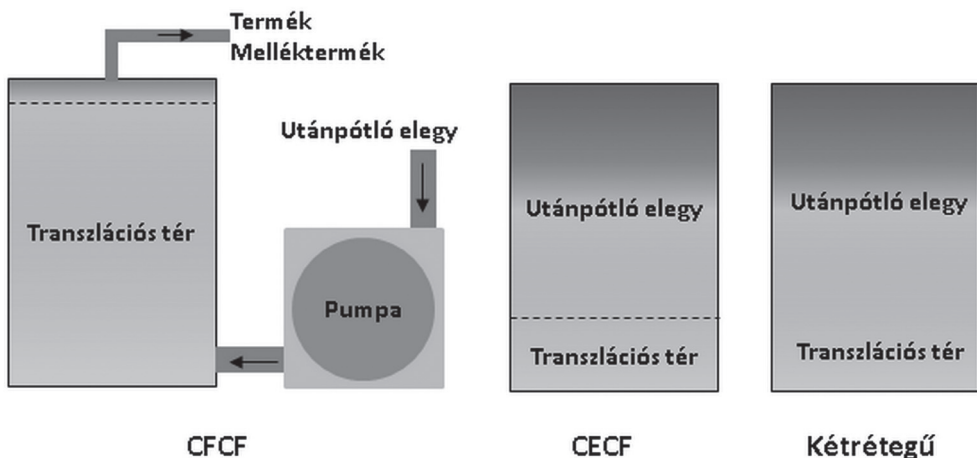
A nagy léptékű nukleinsav-analízis technikai korlátjai jórészt kiküszöbölődtek az utóbbi évtizedben, a genomikai és transzkriptomikai kutatások volumenét tulajdonképp már csak a rendelkezésre álló kapacitások szabják meg. Ideális esetben a fehérjekutatásoknak a genomikai, transzkriptomikai vizsgálatokkal párhuzamosan, azokhoz hasonló sebességgel kellene folyniuk. Annak ellenére, hogy ez a feltételezett ideális állapot a fentebb ismertetett okok következtében nem valósítható meg, számos olyan metodikai fejlesztésnek lehetünk tanúi, amelyek a proteomikai vizsgálatok áteresztőképességét hivatottak növelni. E fejlesztések közé sorolhatjuk az *in vitro* transzlációt is, amely az élő sejteken alapuló fehérjetúltermelő rendszerek egyik fő hátulütőjére, nevezetesen a limitált áteresztőképességre nyújthat megoldást.

Már a múlt század derekától ismert, hogy a transzlációs apparátus nem igényel intakt sejteket, megfelelő körülmények között *in vitro* is képes fehérjék szintézisére (Littlefield et al. 1955). A transzláció robusztusságának köszönhetően, az *in vitro* transzláció alkalmazásával került megfejtésre a genetikai kódszótár, és ezen keresztül ismerhettük meg a transzláció alapvető mechanizmusát is (Byrne et al. 1964; Nirenberg et al. 1966). Az *in vitro* transzláció nyújtotta lehetőségek kiaknázásának korai szakaszában a transzlációs apparátus forrásaként szolgáló sejtek riboszómájához kötött, endogén mRNS-ei által kódolt fehérjék szintézisére irányultak a vizsgálatok, azonban hamarosan megjelentek az exogén mRNS hozzáadásával működő rendszereket bemutató közlemények is (Nirenberg és Matthaei 1961; Roberts és Paterson 1973; Pelham és Jackson 1976).

Jóllehet a hozzáadott mRNS-sel működő *in vitro* transzláció megjelenése egyben a rendszer irányított fehérjetermelésre történő alkalmazhatóságát is előrevetítette, ennek a lehetőségnek a gyakorlati megvalósulása még évtizedekig váratott magára, az ilyen célokra optimalizált rendszerek csak a 80-as években jelentek meg. A korai exogén fehérjék termelésére kifejlesztett *in vitro* transzlációs rendszerek reakcióelegye egy fázisban tartalmazta a transzlációhoz szükséges összes komponenst. Ez az elrendezés a fehérjék rendkívül gyors és egyszerű előállítását teszi lehetővé, kapacitása azonban korlátozott, csak mikrogramm alatti fehérjemennyiségek szintézisére alkalmazható. Sok esetben már az ilyen nagyságrendű fehérje előállítása is elegendő kísérleti anyagot biztosíthat, de legtöbbször ennél nagyobb mennyiségű fehérje kinyerése kívánatos. Az egyfázisú *in vitro* transzláció alacsony hatékonyságának elsődleges oka a nagy energiájú foszfátkészlet gyors kimerülése és ennek következtében a fehérjeszintézis leállása. A probléma kiküszöbölésére az első megoldást a folyamatos

áramlásos sejtmentes (continuous-flow cell-free, CFCF) rendszer jelentette, melyben a translációs apparátust és mRNS-t tartalmazó elegyen keresztül folyamatosan áramoltatjuk az energia- és aminosavakat egyaránt tartalmazó puffert (1. ábra) (Spirin et al. 1988). Habár a módosítás a fehérjeszintézis hatékonyságának több százszoros emelkedését eredményezte, összeállítása körülményes, így további fejlesztésre szorult. A CFCF alternatívájaként szolgálhatnak az ahhoz hasonló hatékonyságú, de jóval egyszerűbben kivitelezhető, folyamatosan cserélődő (continuous-exchange cell-free, CECF) és kétrétegű (bilayer) sejtmentes fehérjeszintetizáló rendszerek (1. ábra) (Kim és Choi 1996; Sawasaki et al. 2002). Az előbbi variációban az energia- és szubsztrátutánpótlást biztosító puffer dialízis membránnal kerül elválasztásra a translációs apparátust és mRNS-t tartalmazó reakciótértől, míg a kétrétegű elrendezésben a nagyobb sűrűségű translációs elegyet egyszerűen alárétegezzük az utánpótló puffernek. Mindkét elrendezés alkalmas milligrammos nagyságrendű fehérjetermelésre, a CECF némileg hatékonyabb, a kétrétegű azonban jobban megfelel a nagy átérésztőképességű rendszerek elvárásainak.

Az *in vitro* transláció alapját a sejtekből izolált translációs apparátus adja, ez tulajdonképpen egy totál sejt kivonatot jelent, amely a riboszóma alegységek mellett tartalmazza a translációhoz szükséges fehérjefaktorokat, tRNS-eket és aminoacil-tRNS szintetázokat is. *In vitro* translációra alkalmas kivonat elméletileg bármilyen aktívan fehérjét szintetizáló sejtből kinyerhető, gyakorlatban azonban az *E. coli*-ból, a nyúl retikulocitából, és a búzacsírából származó kivonatok terjedtek el. Előállítási költség és translációs hatékonyság szempontjából az *E. coli* kivonat az optimális, azonban a prokarióta translációs mechanizmus, a megfelelő dajkafehérjék és poszttranszlációs módosítások hiányának következtében az eukarióta fehérjék gyakran zárványtest



1. ábra. A nagy hatékonyságú *in vitro* translációs rendszerek lehetséges elrendezései: folyamatos áramlásos (continuous-flow cell-free, CFCF), folyamatosan cserélődő (continuous-exchange cell-free, CECF) és kétrétegű

formájában kicsapódnak a bakteriális *in vitro* translációs rendszerekben, így használhatósága korlátozott. A fentebbi két eukarióta sejt kivonat közül a búzacsíra alapú rendelkezik több kedvező tulajdonsággal. A búzacsíra könnyen beszerezhető, a belőle készült preparátumban kevés endogén mRNS található, és a csíra kivonat kodonkészletek szempontjából flexibilis, így változatos organizmusokból származó, eltérő kodonpreferenciával rendelkező kódoló régiókról közel azonos hatékonysággal szintetizálja a fehérjéket (Endo és Sawasaki 2006).

Az általános eukarióta translációhoz elengedhetetlen az mRNS érése során kialakuló 5' metilguanozin sapka és 3' poliA farok, ezek hiányában a fehérjeszintézis hatékonysága csak töredéke lehet az elérhető maximumnak. Az *in vitro* transzkripcióval előállított mRNS metilguanozin sapkával történő jelölése technikailag nehezen kivitelezhető folyamat, a hosszú poliA szekvencia pedig instabillá teszi a bakteriális vektorokat. Yaeta Endo munkacsoportja e problémák eliminálására kifejlesztett egy olyan búzacsíra alapú *in vitro* translációra alkalmas vektort, melynek translációs aktivitása megközelíti a módosított mRNS-ét. A vektorról SP6 RNS polimerázzal átírt mRNS-ben a metilguanozin sapkát a GAA triplet és a dohány-mozaikvírus translációt erősítő szekvenciája helyettesíti, míg a poliA helyett egy 1500 nukleotid hosszúságú 3' nem translálódó régió található (Sawasaki et al. 2002). A vektoruk segítségével a korábban optimalizált búzacsíra kivonatuk milligrammos mennyiségű fehérje *in vitro* szintézisére vált alkalmassá (Madin et al. 2000). Munkacsoportunk ezt a vektort használva igazolta az *Arabidopsis* CDKA;1, CDKB2;1 és CYCB1;1 fehérjék közötti kölcsönhatást. A fentebb jelzett *in vitro* translációs búzacsíra-kivonatban szintetizáltuk a fehérjéket, és az immunoblott analízis és *in vitro* kinázaktivitás-vizsgálatok egyaránt megerősítették a kérdéses fehérjék közötti funkcionális kölcsönhatást (Weingartner et al. 2004).

A búzacsíra *in vitro* transláció egyik legfontosabb előnye, hogy az eukarióta fehérjék túlnyomó többsége natív szerkezetét veszi fel, és enzimaktivitással is rendelkezik. Az *in vitro* kinázaktivitás-mérések alapján a vizsgált 439 *Arabidopsis* fehérje kináz közül 207 rendelkezett aktivitással a búzacsíra-kivonatban történő translációt követően (Sawasaki et al. 2004). Egy későbbi kutatás azt is bizonyította, hogy a búzacsíra alapú transláció alkalmazhatósága nem korlátozódik növényi fehérjék előállítására, ugyanis a mintegy 13 000 különböző humán fehérjét tanulmányozó, átfogó kísérlet során a fehérjék döntő része megfelelő hatékonysággal translálódott. Ez utóbbi közlemény azt is demonstrálta, hogy a 200 mikroliteres translációs reakció átlagos fehérjehozama 4 mikrogramm körül alakul, és ez a mennyiség a reakcióterfogat emelésével arányosan növelhető. A nagy léptékű fehérjevizsgálatok szempontjából nézve talán még fontosabb, hogy a reakció térfogata csökkenthető is. Ennek gyakorlati jelentőségét demonstrálták azzal, hogy egy több mint 13 000 fehérjepontot hordozó chipet hoztak létre búzacsíra-kivonatban termelt fehérjék üveglapra nyomtatásával (Goshima et al. 2008).

A fenti két publikáció jól illusztrálja a kétrétegű búzacsíra *in vitro* translációs rendszerben rejlő lehetőségeket. Az *in vitro* transzkripció és a kétrétegű translációs rendszer könnyen automatizálható, alkalmassá tehető nagyszámú fehérje egyidejű elő-

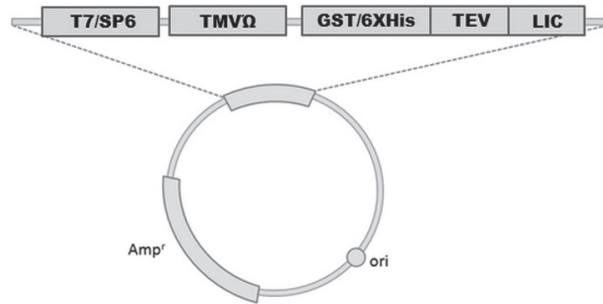
állítására, így a DNS-től a fehérjéig vezető munkafolyamat szűk keresztmetszetét a transzkripció templátként szolgáló DNS előállítása jelenti. A két fentebbi közlemény ezt a problémát eltérő megoldásokkal hidalja át. Az első esetben a fehérje kódoló régióját tartalmazó DNS-szekvenciát az ún. hasított primer módszerrel két lépésben amplifikálják, így a keletkezett PCR termék a kódoló szekvencia mellett tartalmazza a transzkripcióhoz szükséges promotert és a translációhoz szükséges 3' és 5' nem translálódó régiókat is. A második megközelítésnél a búzacsíra-transzlációra alkalmas „Gateway destination” vektorokat hoztak létre, így amennyiben a szintetizálendő fehérjéket kódoló szekvenciák „Gateway entry” vektorban elérhetők, a lambda bakteriofág rekombináz enzimet használva gyorsan és egyszerűen létrehozhatók a megfelelő fehérje translációjára alkalmas vektorkonstrukciók.

Munkacsoportunk a termelendő fehérjéket kódoló *in vitro* translációs vektorok előállítására egy harmadik stratégiát követett, melynek során a búzacsíra alapú sejtmentes fehérjeszintézisre optimalizált pEU vektorokat tökéletesítette tovább. Fejlesztésünkkel a pEU vektorok két hiányosságát kívántuk orvosolni, úgymint az előállítandó fehérjét kódoló vektorok körülményes előállítását, illetve a keletkezett fehérjék egyedi protokollt igénylő tisztítását.

Az első problémára a ligálásfüggetlen klónozás (LIC) tűnt a legígéretesebb megoldásnak (Aslanidis és de Jong 1990). A módszer alapját a T4 polimeráz 3'-5' exonukleáz aktivitása adja, és alkalmazásával bármilyen DNS-szekvencia irányítottan, generális protokoll alkalmazásával inszertálható a megfelelő vektorba. A LIC során a tompa végű restrikciós endonukleázzal linearizált vektorban T4 polimeráz kezeléssel a hasítási hely mindkét oldalán 12–15 nukleotidnyi 5' túlnyúló véget hozunk létre. A vektorba illesztendő DNS-szakaszt olyan primerekkel amplifikáljuk, melyeknek 5' végei a LIC-re alkalmas szekvenciát tartalmaznak, így a PCR termék a T4 kezelést követően a vektorban kialakított túlnyúló végekkel komplementer egyszálú végekkel rendelkezik. Az ily módon előkészített vektor és PCR termék összekeverését követően a DNS-fragmentum a bázispárosodás szabályainak engedelmessé válik irányítottan illeszkedik a vektorba. Az elegy közvetlenül, ligálás nélkül használható a kompetens sejtek transzformálására. A módszerrel hatékonyan és gyorsan állíthatók elő a DNS-inszerteket megfelelő pozícióban hordozó vektorok.

A vektor második hiányosságát, a szintetizálódott fehérje nehézkes tisztítását affinitás-kromatográfiára alkalmas, jelölő peptidmotívumok használatával kívántuk megoldani. Ennek érdekében a pEU vektorokat úgy módosítottuk, hogy a LIC helyett megelőzően, azzal egy nyílt leolvasási keretbe esően 6 hisztidint (6xHis), illetve glutation-S-transzferázt (GST) kódoló szekvenciákat illesztettünk. Mindezek következtében a vektor által kódolt rekombináns fehérjék, kétértékű fémkelát, illetve glutation gyanták segítségével egy lépésben általában több mint 80–90%-os tisztasággal szeparálhatók a translációs elegyből.

A rekombináns fehérjék az affinitás-kromatográfiás gyantára való kapcsolódásukat követően két módszerrel nyerhetők ki natív formában. Az általánosabban kivitelezett eljárás szerint a gyantát a megfelelő kompetitort tartalmazó vegyületet, úgymint imidazol, illetve redukált glutationt tartalmazó pufferrel inkubáljuk, így a rekombináns

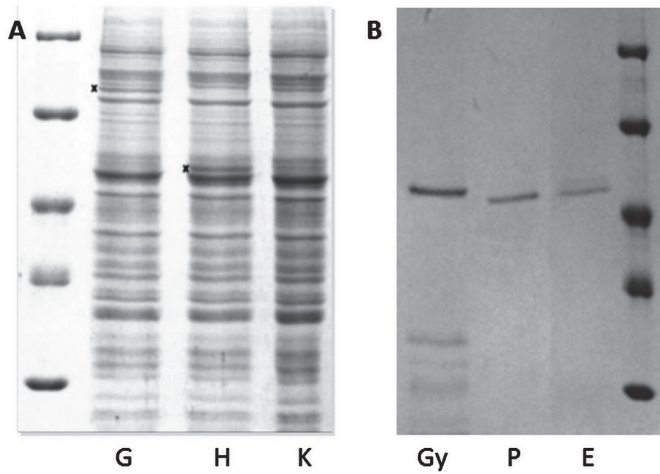


2. ábra. A módosított búzacsíra *in vitro* transzlációs vektor sematikus ábrája:

SP6, illetve T7 RNS polimeráz promóter (SP6/T7), a dohány-mozaikvírus transzlációt fokozó szekvenciája (TMV Ω), glutation-S-transzferáz, illetve hexahisztidin affinitástisztítás motívum (GST/6XHis), dohány karcolatos vírus proteáz felismerő hely (TEV), ligálásfüggetlen klónozó hely (LIC), replikációs origo (ori) és antibiotikumrezisztencia-gén (Amp)

fehérjét leszorítjuk a gyantáról. A második, a szelektív proteázokon alapuló módszer két megfontolásból is előnyösebb. Egyrészt, amennyiben a fehérjét a kompetitorral történő inkubáció helyett proteázzal történő hasítással nyerjük ki a gyantáról, akkor általában nagyobb tisztaságú fehérjét kapunk, hiszen a proteáz csak a rekombináns fehérjében található peptidmotívumnál hasít, így az oszlophoz nem specifikusan kapcsolódó fehérjék nem jelennek meg a végső preparátumban. Másrészt a viszonylag nagy méretű, 23 kDa-os GST jelölés eltávolítása sok esetben alapvető elvárás, mert egy ilyen méretű plusz fehérjedomén már jelentősen befolyásolhatja a szintetizált fehérje tulajdonságait, így a további vizsgálatok előtt a GST lehasítandó. Az általunk előállított vektorok segítségével transzlált rekombináns fehérjék a dohány karcolatos vírus (TEV) proteáz felismerő helyét tartalmazzák. A TEV proteáz az általánosan alkalmazott proteázok közül kiemelkedik széles puffertoleranciájával és nagyfokú szelektivitásával. A vektor tervezése során úgy alakítottuk ki a LIC helyett, hogy annak része a TEV felismerő helyét, az ENLYFQS peptidet kódoló nukleinsav-szekvencia is, így a fehérje tisztítását követően a 6xHis aminosav szextett, illetve a GST könnyen lehasítható (2. ábra) (Bardóczy et al. 2008).

A létrehozott vektorkonstrukciókat egy *Arabidopsis* fehérje kinázzal, az AtMPK6 előállításával teszteltük. Eredményeink igazolták, hogy a vektorok alkalmazásával a kétrétegű búzacsíra transzlációs rendszerben egy lépésben nagy tisztaságú, mintegy 10 mikrogrammnyi fehérje állítható elő (3. ábra). A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy az előállított fehérje mennyiben alkalmazható funkcionális analízisre. Ennek érdekében az AtMPK6-ot *E. coli* fehérjetultermelő rendszerrel és kétrétegű transzlációval egyaránt előállítottuk. A tisztított kinázok 100 nanogrammjának *in vitro* aktivitását mértük mielőtt bázikus fehérje szubsztrátként történő alkalmazásával. Az eredmények megerősítették várakozásainkat, a transzlációval termelt fehérje aktivitása any-



3. ábra. Az AtMPK6 fehérje *in vitro* translációja és affinitástisztítása. A: GST, illetve 6XHis jelölt AtMPK6 analízise Coomassie kék festett denaturáló poliakrilamid-gélen teljes translációs elegyben.

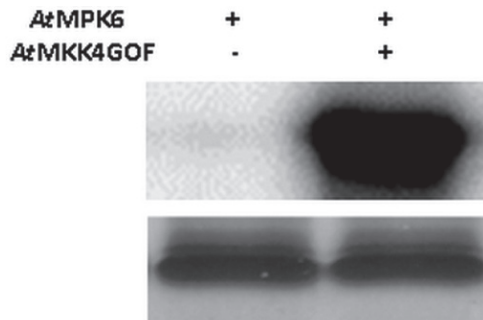
A szintetizált AtMPK6 fehérjét pontok jelölik. GST-AtMPK6 (G), 6XHis-AtMPK6 (H) és exogén mRNS-mentes translációs elegy (K). B: A 6XHis-AtMPK6 affinitástisztítás analízise Coomassie kék festett denaturáló poliakrilamid-gélen. A Ni-kelát gyantához kapcsolt (Gy), a proteázzal hasított (P), valamint az imidazzollal eluált fehérjepreparátum

nyival nagyobb volt, hogy a két eltérő megközelítéssel előállított kináz aktivitása össze sem vehető egymással (Bardóczy et al. 2008). A kifejlesztett vektorok széles körű alkalmazhatóságát számos, változatos organizmusból származó fehérje termelésével bizonyítottuk, a későbbiekben pedig a metodika részletes leírását is elérhetővé tettük (Sonkoly et al. 2011).

Az eukarióta fehérjék túlnyomó része csak a megfelelő poszttranszlációs módosítások nyomán alakítja ki megfelelő térszerkezetét, illetve válik funkcionálisan aktívvá. A búzacsíra-kivonattal történő fehérjeszintézis ebből a szempontból is optimális választás, mivel a megfelelő körülmények biztosításával a glikoziláció kivételével szinte minden poszttranszlációs módosítás egyszerűen kivitelezhető ezzel a módszerrel (Carlson et al. 2012). Laboratóriumunk a búzacsírarendszernek ezt az előnyét az AtMPK6 aktivitásának növelésére használta ki. A mitogén aktivált protein kinázok (MAPK) általános aktiválási mechanizmusa a T-hurokban elhelyezkedő TXY aminosav motívum treoninjának és tirozinjának foszforilációja. A mintegy 50 000-szeres aktivitásnövekedést eredményező foszforilációért a kettős specifitással rendelkező MAPK kinázok (MKK) felelősek. A TXY motívum aminosavai *in vivo* meghatározott sorrendben módosulnak, először a tirozin, majd a treonin foszforilálódik (Mészáros et al. 2007). A kétlépéses foszforilációs mechanizmus következtében az aktív MAPK előállítására nem megfelelő az egyéb foszforilációt igénylő kinázoknál alkalmazott *in vitro* mutagenézisen alapuló megközelítés, mely szerint számos kináz konstitutívan

aktív változata létrehozható a foszforilálandó treonin vagy tirozin negatívan töltött aminosavra történő cseréjével. A MAPK-ok esetében a megfelelő treonin és tirozin *in vitro* mutagenézise nem vezet a kinázaktivitás emelkedéséhez, a MAPK-ok foszforilációját biztosító MKK fehérjék konstitutívan aktív mutáns változatai azonban már létrehozhatók ilyen módon. Az aktív kináz változatok előállításához a növényi MKK-kra jellemző S/TXXXXXS/T aktivációs hurokban található treoninok, illetve szेरinek aszparaginre történő cseréje szükségeltetik. Munkacsoportunk ennek megfelelően az AtMKK4, az AtMPK6 egyik aktivátor kinázának konstitutívan aktív variánsát hozta létre és alkalmazta az *in vitro* transzláció során. Az aktivált AtMPK6 szintéziséhez a kétrétegű transzlációs elegyhez 10:1 arányban adtuk az AtMPK6-t és AtMKK4-t kódoló mRNS-t, majd ezt követően a MAPK-t nikkkel-kelát kromatográfiával tisztítottuk. Az *in vitro* kinázaktivitás mérések alapján kijelenthető, hogy az AtMPK6 aktiválása – az *in vivo* aktivációs mechanizmusnak megfelelően – sok ezerszeresére fokozható a megfelelő MKK-val történő kotranszlációval (4. ábra).

A fehérjekinázok funkcionális tanulmányozásának egyik fontos aspektusa *in vivo* szubsztrátjaiknak leírása. A lehetséges kináz-szubsztrát kapcsolatok egyértelmű igazolása egy olyan rendkívül komplex, többféle metodikán alapuló folyamat, melynek során megkerülhetetlen a tanulmányozandó kináz aktív formában történő kinyerése. A laboratóriumunkban kidolgozott módszer a kinázok *in vitro* szubsztrátjainak vizsgálatában nyújt segítséget, így alkalmazása kiindulási pontot adhat a feltételezett kináz-szubsztrát partnerek azonosításához. Az eljárás során a fentiekben ismertetett módszert használva a vizsgálandó kinázt és a szubsztrátjelölt fehérjéket egyaránt *in vitro* transzlációval állítjuk elő. A búzacsíraféherje-kivonatban található endogén kinázok foszforilálhatják a szubsztrátjelölteket, így azokat az *in vitro* kinázreakciót megelőzően λ -foszfatázzsal kezeljük. Az ily módon kapott, defoszforilált fehérjéket hideg ATP és aktív kináz hozzáadásával foszforiláljuk, majd a reakcióelegyet poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztjuk, és a foszforilált fehérjéket foszfoproteinekre



4. ábra. Az AtMPK6 aktivitásának növelése kotranszlációval. A Ni-kelát ágyhoz kötött AtMPK6, illetve az AtMKK4GOF-fal kotranszlált AtMPK6 *in vitro* kinázaktivitásának vizsgálata mielőtt bázikus fehérje (MBP) mesterséges szubsztrátként történő használatával. A felső panelen a poliakrilamid-gélen elválasztott MBP autoradiogram képe, míg az alsón ugyanazon gél Coomassie festése látható

specifikus fluoreszcens festékekkel tesszük láthatóvá. Ezzel a megközelítéssel viszonylag gyorsan, egyszerűen és radioaktivitás használata nélkül vizsgálhatunk akár nagyszámú feltételezett kináz-szubsztrát kapcsolatot is (Nagy és Mészáros 2014).

A fehérjék a sejten belül a legritkább esetben töltik be funkciójukat önállóan, általában több fehérjével történő kölcsönhatás nyomán, fehérjekomplexek kialakításával látják el feladatukat, minek következtében a proteomikai kísérletek egyik központi eleme a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata. Az *in vivo* fehérje-kölcsönhatások minden kétséget kizáró igazolása rendkívül komplex feladat, és csakis élő sejtek alkalmazásával lehetséges. Mindazonáltal a fehérje-fehérje kölcsönhatások *in vitro* tanulmányozása fontos orientációs pontot nyújt a további vizsgálatokhoz. Az ilyen irányú kísérletekkel kapcsolatos alapvető elvárás a viszonylag egyszerű és gyors kivitelezhetőség. Ezeknek a kritériumoknak tökéletesen megfelel az *in vitro* transzláció „keverés és mérés” (mix-and-measure) módszerekkel való kombinálása. A két technika együttes alkalmazása lehetővé teszi a vizsgálandó fehérjék kölcsönhatásának transzlációt követő, mindennemű tisztítást és elválasztást nélkülöző közvetlen detektálását.

Nagyfokú érzékenysége következtében a „keverés és mérés” metodikák közül az ALPHA (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) a legelterjedtebb. A módszer a különböző fehérjékkel jelölhető donor és akceptor gyöngyök kölcsönhatásán alapul. A donor gyöngy olyan fotoszenzitív anyagot tartalmaz, amely 680 nm fényel történő megvilágítás hatására szinglet oxigént termel. A keletkezett szinglet oxigén az akceptor gyöngyhez diffundál, és az abban található tioxénszármazékkal reagálva kemilumineszcenciát generál. Az akceptor gyöngy a tioxén mellett olyan fluorofórt is tartalmaz, mely kemilumineszcenciával indukálható, így a szinglet oxigén végső soron fluoreszcens jelként detektálható. A fluoreszcencia létrejöttének elengedhetetlen feltétele a donor és az akceptor gyöngy megfelelő közelsége, mivel a szinglet oxigén csak 200 nm-t tud megtenni az oldatban, mielőtt visszakerülne alapállapotába. Ez a távolsági feltétel csak akkor teljesülhet, ha a gyöngyök kölcsönható fehérjékkel jelöltek, és így a két gyöngy a fehérjék interakcióján keresztül megfelelő közelségbe kerül. A módszer rendkívül érzékeny a nagy mennyiségben keletkező szinglet oxigén jelerősítő hatásának köszönhetően, a gerjesztési hullámhossznál rövidebb hullámhosszon történő fluoreszcenciadetektálás pedig az alacsony háttérrel biztosítja (5. ábra) (Eglen et al. 2008).

Munkacsoportunk a fogból sejteinek odontoblasztokká történő differenciálódásának tanulmányozásában közreműködik. Ennek keretében a differenciáció antagonistájának, a Noggin fehérjének a hatását kívánjuk kiküszöbölni a Nogginhoz szelektíven kötődő egyszálú oligonukleotidok, ún. aptamerok előállításával. A Noggin gátló hatását a differenciációt indukáló növekedési faktor, a csont morfogénikus fehérje 2 (bone morphogenic protein 2, BMP2) kötésével fejt ki (Qin et al. 2012). Munkánk során a megfelelő aptamer előállításának sikerességét a Noggin és BMP2 fehérje közötti kölcsönhatás mérésével ellenőrizzük az ALPHA módszer segítségével. A mérések kivitelezéséhez a módosított GST, illetve 6XHis jelölést biztosító pEU vektorainkba inszertáltuk a Noggin, illetve BMP2 fehérjéket kódoló szekvenciákat. A vektorok *in vitro* transzkripciójával nyert mRNS-ről a kétrétegű búzacsíra rendszerrel fehérjéket ter-

meltettünk. A sikeres transzlációt követően a két különböző fehérjét tartalmazó elemet megfelelő hígítás után összekevertük. Az ily módon nyert oldathoz AlphaScreen Ni-kelát akceptor és GST ellenanyaggal módosított donor gyöngyöket adtunk, majd egy óra inkubációt követően mértük a fluoreszcens jelet. A kontrollmintáknál kapott fluoreszcenciaértékkel összevetett mérési eredmények egyértelműen igazolták a korábbi közleményekből már ismert Noggin és BMP2 fehérjék közötti kölcsönhatást (5. ábra B). A következő lépésben az előállított aptamereink Noggin-BMP2 interakcióra kifejtett hatását kívántuk tanulmányozni, így a fehérjekölcsönhatás-vizsgálatokat megelőzően a Noggin fehérjét tartalmazó oldatot az aptamerekkel előinkubáltuk. A lumineszcenciamérések megerősítették várakozásainkat, az előállított aptamerünk szignifikánsan gátolta a két fehérje közötti kölcsönhatást (5. ábra C).

A proteomika egyik legfontosabb kutatási területe és egyben legnagyobb kihívása a membránfehérjék vizsgálata. E fehérjék tanulmányozásának kiemelt jelentőségét az adja, hogy számos képviselőjük a sejtbe irányuló jelátviteli útvonalak iniciátora, így egyben feltételezhetően ideális gyógyszer-célpont is. Kihívásnak pedig azért tekinthetjük vizsgálatukat, mert a membránfehérje-kutatások több szempontból is nehézségekbe ütköznek. Habár a prokarióta és eukarióta genomok által kódolt fehérjéknek mintegy 20–30%-a membránintegráns fehérje, az egyes membránfehérjék többsége csak kis mennyiségben van jelen a sejtekben, így eredeti forrásból történő tisztításuk rendkívül alacsony hatékonyságú. A membránfehérjék vizsgálatával kapcsolatos további technikai nehézség a sajátosságuk következménye. A foszfolipid kettősrétegből formálódó, membránba ágyazott fehérjék felszínén a hidrofób aminosavak dominálnak, így vizes oldatokban rosszul oldódnak, gyakran elvesztik natív szerkezetüket, és kicsapódnak. A membránfehérjék hidrofób tulajdonsága nemcsak a tisztításuk során jelent problémát, legtöbb esetben a sejtes rendszerekben történő termeltetésük is körülményesen kivitelezhető, hiszen csak a sejtek membránjába lokalizált fehérjéknek van jó esélyük a natív szerkezetük kialakítására, így a sejtekben rendelkezésre álló membrán limitálja az előállítható fehérje mennyiségét, a túltermelésük pedig toxikus a sejtekre. Ráadásul a szintetizálódó fehérjék megfelelő membránba irányítása és sejten belüli transzportja további leküzdendő akadályt jelent. Mindezen problémák áthidalására változatos, membránfehérjék előállítására alkalmas, prokarióta és eukarióta sejteken nyugvó rendszereket hoztak létre, de egyik sem biztosítja a rutinszerű alkalmazhatóságot (Trimpin és Brizzard 2009). A membránfehérje-kutatásokkal kapcsolatos nehézségeket jól illusztrálják a fehérjeszerkezeti vizsgálatok eredményei. Míg a citoplazmatikus fehérjék harmadlagos szerkezetét tartalmazó adatbázisok dinamikusan növekszenek, sok ezer fehérjét tartalmaznak, addig a membránfehérjéket bemutató megfelelőik csak néhány száz fehérjével büszkélkedhetnek.

A hidrofób tulajdonságokkal rendelkező fehérjék többsége az *in vitro* transzláció során, a sejtes fehérje-túltermeléshez hasonlóan kicsapódik. Ezt a problémát két eltérő megközelítéssel sikerült megoldani. Az első megközelítést az *E. coli*-ból származó sejt-kivonattal alkalmazták. Több, különböző számú transzmembrán doménnel rendelkező bakteriális membránfehérjét állítottak elő *in vitro* transzlációval. Az első

megfigyelésük az volt, hogy habár olyan fehérjék is szintetizálhatók, amelyek bakteriális fehérje-túltermeléssel nem termelhetők, a keletkezett fehérjék szinte teljes egészében csapadékot képeznek. Következő lépésként azt vizsgálták, hogy a transzlációs elegy detergensekkel, illetve foszfolipidekkel történő kiegészítése hogyan befolyásolja a membránfehérjék szintézisét. Tapasztalataik szerint sem a detergens, sem a foszfolipid nem változtatták drasztikusan a szintézis hatékonyságát, azonban a keletkezett fehérjék oldékonysága sem módosult érdemben. Végül azt ellenőrizték, hogy a csapadékot képzett fehérjék szolubilizálhatóak-e detergensekkel, illetve foszfolipidekkel. Ezzel a módszerrel sikeresen izoláltak megfelelő térszerkezettel rendelkező membránfehérjéket, amit funkcionális vizsgálatokkal is igazoltak (Klammt et al. 2004). Egy másik munkacsoport a búzacsíra-kivonaton alapuló *in vitro* transzláció alkalmazásával más elképzelés alapján állította össze a membránfehérjék termelésére alkalmas rendszerét. Szójából származó lipidporból liposzómákat készítettek, és ezeket adták hozzá a CECF transzlációs rendszerhez, melynek segítségével több tíz mikrogramm humán citokróm b5 (cytb5) és sztearil-KoA deszaturázt (SCD) termeltettek 50 mikroliter transzlációs elegyben. A transzlációs elegy sűrűséggradiens centrifugálásával a szintetizált fehérjék egyszerűen, nagymértékben tisztíthatók is voltak, a liposzóma frakcióban a fehérjék több mint 80%-át cytb5, illetve SCD adta. A publikáció talán legfontosabb üzenete az, hogy a két fehérje együttes transzlációjával és cytb5 reduktáz hozzáadásával funkcionálisan aktív, zsírsav-deszaturációra képes membránban lokalizált komplex állítható össze (Goren és Fox 2008).

Laboratóriumunk ez utóbbi, liposzómát használó megközelítést alkalmazta az ismeretlen funkcióval rendelkező humán GLUT10 fehérjetranszport aktivitásának felderítésére. Tojás lecitinből előállított liposzómákat adtunk a búzacsíra egyfázisú transzlációs rendszerhez, majd két óra inkubációs idő után Western blott segítségével ellenőriztük a fehérjeszintézis hatékonyságát. A transzlációs elegy centrifugálását követően a GST jelölt GLUT10 fehérjét a liposzómákat tartalmazó, felülülő frakcióban azonosítottuk. Az ily módon nyert GLUT10 proteoliposzómák transzportaktivitását négy különböző, radioaktívan jelölt szubsztrát alkalmazásával rapid filtrációval vizsgáltuk. Kísérleteink igazolták várakozásainkat, miszerint a GLUT10 dehidroaszorbát transzporterként funkcionál, mivel szacharóz és UDP-glükuronsav hozzáadásával nem detektáltunk transzportaktivitást, az aszkorbát esetében minimális, míg dehidroaszorbát adagolásával karakteres transzport volt mérhető.

A 21. századi molekuláris biológiai kutatásokat talán a holisztikus jelző írja le legjobban, egy adott kérdést sok szempontból vizsgálunk, egyszerre elemezzük a DNS-, RNS- és fehérjeprofil, és az így kapott eredményeket egymással összefüggésben vizsgáljuk. Vitathatatlan, hogy ezzel a megközelítéssel a valósághoz sokkal jobban közelítő modelleket állíthatunk fel, és realisabban értelmezhetjük az élőlényekben lejátszódó folyamatokat, azonban a jelenségek teljességükben történő vizsgálata elképzelhetetlen a megfelelő metodikai háttér nélkül. A nukleinsavak nagy léptékű analízisére alkalmas eszközök és módszerek már évtizedek óta rendelkezésünkre állnak, a fehérjevizsgálatokra vonatkozó megfelelőik azonban csak a század elején indultak robbanásszerű fejlődésnek. A nagy érzékenyséű tömegspektrometriás berendezé-

sek és az ezekhez kapcsolódó informatikai rendszerek megjelenése a fehérjék azonosítása szempontjából hozott áttörést. A fehérjék meghatározása, aminosav-szekvenciájuk ismerete azonban sok esetben nem nyújt egyértelmű információt annak funkciójáról, így szerepük tisztázása további karakterizálást igényel. Az ilyen irányú kísérletek kivitelezéséhez elegendő mennyiségű és tisztaságú fehérje szükséges. Ezeknek a vizsgálatoknak a fehérjeigényét általában élő sejteken alapuló fehérjetúltermeléssel fedezik, mára azonban az *in vitro* transzlációs rendszerek már reális alternatívái a sejtes fehérjeszintézisnek. Sőt mi több, a fentebb bemutatott példák alapján kijelenthetjük, hogy bizonyos tekintetben már meg is haladták azokat, így a jövőben minden bizonnyal szélesebb körben alkalmazott metodikái lesznek a proteomikai kutatásoknak.

Felhasznált irodalom

- Aslanidis, C.–de Jong, P. J. (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* 18: 6069–6074.
- Bardóczy, V.–Gécsi, V.–Sawasaki, T.–Endo, Y.–Mészáros, T. (2008) A set of ligation-independent *in vitro* translation vectors for eukaryotic protein production. *BMC Biotechnol* 8: 32.
- Byrne, R.–Levin, J. G.–Bladen, H. A.–Nirenberg, M. W. (1964) The *in Vitro* Formation of a DNA-Ribosome Complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 52: 140–148.
- Carlson, E. D.–Gan, R.–Hodgman, C. E.–Jewett, M. C. (2012) Cell-free protein synthesis: applications come of age. *Biotechnol Adv* 30: 1185–1194.
- Eglen, R. M.–Reisine, T.–Roby, P.–Rouleau, N.–Illy, C.–Bosse, R.–Bielefeld, M. (2008) The use of AlphaScreen technology in HTS: current status. *Curr Chem Genomics* 1: 2–10.
- Endo, Y.–Sawasaki, T. (2006) Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr Opin Biotechnol* 17: 373–380.
- Goren, M. A.–Fox, B. G. (2008) Wheat germ cell-free translation, purification, and assembly of a functional human stearyl-CoA desaturase complex. *Protein Expr Purif* 62: 171–178.
- Goshima, N.–Kawamura, Y.–Fukumoto, A.–Miura, A.–Honma, R.–Satoh, R.–Wakamatsu, A.–Yamamoto, J.-I.–Kimura, K.–Nishikawa, T.–Andoh, T.–Iida, Y.–Ishikawa, K.–Ito, E.–Kagawa, N.–Kaminaga, C.–Kanehori, K.-I.–Kawakami, B.–Kenmochi, K.–Kimura, R.–Kobayashi, M.–Kuroita, T.–Kuwayama, H.–Maruyama, Y.–Matsuo, K.–Minami, K.–Mitsubori, M.–Mori, M.–Morishita, R.–Murase, A.–Nishikawa, A.–Nishikawa, S.–Okamoto, T.–Sakagami, N.–Sakamoto, Y.–Sasaki, Y.–Seki, T.–Sono, S.–Sugiyama, A.–Sumiya, T.–Takayama, T.–Takayama, Y.–Takeda, H.–Togashi, T.–Yahata, K.–Yamada, H.–Yanagisawa, Y.–Endo, Y.–Imamoto, F.–Kisu, Y.–Tanaka, S.–Isogai, T.–Imai, J.-I.–Watanabe, S.–Nomura, N. (2008) Human protein factory for converting the transcriptome into an *in vitro*-expressed proteome. *Nature Methods* 5: 1011–1017.
- Kim, D. M.–Choi, C. Y. (1996) A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane. *Biotechnol Prog* 12: 645–649.
- Klammt, C.–Lohr, F.–Schafer, B.–Haase, W.–Dotsch, V.–Ruterjans, H.–Glaubitz, C.–Bernhard, F. (2004) High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *European Journal of Biochemistry* 271: 568–580.

- Littlefield, J. W.–Keller, E. B.–Gross, J.–Zamecnik, P. C. (1955) Studies on cytoplasmic ribonucleoprotein particles from the liver of the rat. *J Biol Chem* 217: 111–123.
- Madin, K.–Sawasaki, T.–Ogasawara, T.–Endo, Y. (2000) A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 559–564.
- Mészáros, T.–Helfer, A.–Bögre, L. (2007) The More We Know, the Less We Understand?: Complexity of MAP Kinase Signaling. *Plant Signal Behav* 2: 30–32.
- Nagy, S. K.–Mészáros, T. (2014) In vitro translation-based protein kinase substrate identification. *Methods Mol Biol* 1118: 231–243.
- Nirenberg, M.–Caskey, T.–Marshall, R.–Brimacombe, R.–Kellogg, D.–Doctor, B.–Hatfield, D.–Levin, J.–Rottman, F.–Pestka, S.–Wilcox, M.–Anderson, F. (1966) The RNA code and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31: 11–24.
- Nirenberg, M. W.–Matthaei, J. H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 47: 1588–1602.
- Pelham, H. R.–Jackson, R. J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur J Biochem* 67: 247–256.
- Qin, W.–Yang, F.–Deng, R.–Li, D.–Song, Z.–Tian, Y.–Wang, R.–Ling, J.–Lin, Z. (2012) Smad 1/5 is involved in bone morphogenetic protein-2-induced odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod* 38: 66–71.
- Roberts, B. E.–Paterson, B. M. (1973) Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 2330–2334.
- Sawasaki, T.–Hasegawa, Y.–Morishita, R.–Seki, M.–Shinozaki, K.–Endo, Y. (2004) Genome-scale, biochemical annotation method based on the wheat germ cell-free protein synthesis system. *Phytochemistry* 65: 1549–1555.
- Sawasaki, T.–Hasegawa, Y.–Tsuchimochi, M.–Kamura, N.–Ogasawara, T.–Kuroita, T.–Endo, Y. (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products. *FEBS Lett* 514: 102–105.
- Sawasaki, T.–Ogasawara, T.–Morishita, R.–Endo, Y. (2002) A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14652–14657.
- Sonkoly, B.–Bardóczy, V.–Mészáros, T. (2011) Expression and purification of active protein kinases from wheat germ extracts. *Methods Mol Biol* 779: 55–63.
- Spirin, A. S.–Baranov, V. I.–Ryabova, L. A.–Ovodov, S. Y.–Alakhov, Y. B. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242: 1162–1164.
- Trimpin, S.–Brizzard, B. (2009) Analysis of insoluble proteins. *Biotechniques* 46: 321–326.
- Weingartner, M.–Criqui, M. C.–Mészáros, T.–Binarova, P.–Schmit, A. C.–Helfer, A.–Derevier, A.–Erhardt, M.–Bögre, L.–Genschik, P. (2004) Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* 16: 643–657.

V. Onkogének és tumorszupresszorok a növényekben: az E2F-RB szabályozási mechanizmus szerepe

MAGYAR ZOLTÁN

Összefoglalás

A növényekben a növekedés mértékét a sejtosztódás és a sejtmeagnyulás egyensúlya határozza meg. Ezt az egyensúlyt egy evolúciósan konzerválódott transzkripcionális mechanizmus biztosítja, amelyet a benne részt vevő komponensekről E2F-RB szabályozásnak nevezünk. Gyakorlatilag az összes növényi sejt – legyen az őssejt vagy differenciált sejt – osztódási állapota az E2F-RBR működésétől függ. A hibás növényi E2F-RBR mechanizmus az állatokhoz hasonló kontrollálatlan osztódásokhoz vezet. Ennek következményeként nem jönnek létre egészséges ivarsejtek, sérül a differenciálódás és az osztódás közti egyensúly, megváltozik az őssejt állapota és a merisztémák működése. A legújabb eredmények alapján az RBR a különböző sejtállapotokat különböző E2F fehérjékkel szabályozza. A modell szerint az E2FA-RBR komplex az osztódó sejtekben gátolja a differenciálódási gének kifejeződését, aminek köszönhetően fenntartja a sejtek osztódási állapotát. Ezzel szemben, a differenciálódó sejtekben az RBR az E2FB-vel formál komplexet, és az osztódási géneket gátolja. A két aktivátornak nevezett E2F így az RBR-rel komplexben elmentéses folyamatokat szabályoz: az E2FA-RBR a differenciálódást gátolja, míg az E2FB-RBR komplex a differenciálódás felé vezető út egyik első állomása. A terminálisan differenciált sejtállapot kialakításában pedig az E2FC-RBR komplex vesz részt. A komplexek további részletes funkcionális jellemzése révén jobban megérthetjük a növények növekedését szabályozó folyamatokat, ez pedig lehetőséget nyújt arra, hogy idővel a gazdaságilag fontos növények növekedését és ezzel terméshozamát is fokozni lehessen.

Summary

Plant organ growth is regulated in a temporally and spatially coordinated manner by two processes: cell proliferation and cell enlargement. The cell number of plant organs is determined by the timing of transition from proliferative growth to cell expansion. Here we discussed the central role of the E2F-RBR pathway in this decision mechanism. This molecular pathway can potentially determine the division status of all plant cells and consists of quiescent stem cells, dividing progenitor cells and terminally differentiated cells. Accordingly, the missing RBR regulation in plants resulted in uncontrolled cell divisions similar to those in animals. RBR function is required for stem cell maintenance, cell proliferation, cell cycle exit and differentiation. Current data indicates that RBR can regulate these processes by entering into a complex with distinct E2Fs in different cells in various developmental stages. According to this model, E2FA-RBR1 keeps cells in the mitotic cycle, whereas binding of RBR1 to E2FB stimulates cell cycle exit, therefore differentiation. An E2FC-RBR complex might be formed to regulate the terminally differentiated status of the cells. Understanding the functions of these complexes provides the opportunity to understand the molecular mechanism of plant growth that in turn could be applied for further growth improvement in other plant species.

Bevezetés

Az E2F transzkripciós faktorok az osztódás és a differenciálódás közti egyensúly szabályozásában vesznek részt. A *retinoblasztóma* (RB) nevű tumorszupresszor-molekula működésétől függően lehetnek transzkripcionális aktivátorok vagy represszorok. A hibás E2F-RB szabályozás kóros sejtosztódáshoz, daganatok kialakulásához vezethet. Míg az ember esetében a rákos megbetegedések a halálozási listák élén állnak, a növények ellenállóak a hasonló elváltozásokkal szemben. Az E2F-RB szabályozási mechanizmus azonban a növényekben is megtalálható, és az evolúció során meglepően jól konzerválódott. Mi lehet a szerepe ennek a szabályozásnak a növények fejlődésében és növekedésében, mennyire idomult ez a molekuláris mechanizmus a növényi életmódhoz, és mi történik a növényekkel, ha ezek az onkogének és tumorszupresszorok meghibásodnak? Az alábbi fejezetben többek között ezekre a kérdésekre keresem a választ.

A növényi növekedés szabályozása

„Képzeljük el az őssejtkutatók izalmát, ha a Pathfinder űrhajó olyan lények felfedezéséről küldene riportot, akik a fejükön található speciális szerv révén akár 2000 évig is élélnének, és ezt a képességüket a mi őssejtjeinkhez hasonló sejtjeiknek köszönhetnék. Hogyan működhetnek ezek a sejtek? És miben különböznek az állati őssejtektől? Izgalmas kérdések. Nem kell azonban elhagyni a Galaxist azért, hogy ezeket a sejteket görcső alá vegyük, hiszen ilyen lények élnek itt velünk a Földön is, ezek a növények, amelyek az evolúció során az állatokhoz hasonlóan egysejtes, de azoktól eltérő ősi sejtéből fejlődtek ki” (Scheres 2007).

Bár a növények testfelépítése a fotoszintézisre specializálódott, az állatokhoz hasonlóan sejtekből építkeznek. Az állatokkal ellentétben a növények nemcsak embrionális fejlődésük alatt, hanem egész életük során képesek új szerkezet létrehozni. Ezt a képességüket a merisztematikus régiókban található őssejtjeiknek köszönhetik. Már az embrionális fejlődés során kialakul a növények két legjobban ismert, a gyökér- és a hajtáscsúcsban elhelyezkedő merisztémája (1. ábra). A hajtás a szár növekedéséért és a levelek kialakulásáért, a gyökérmerisztéma pedig a gyökér fejlődéséért és növekedéséért felelős. A merisztémában a sejtek differenciálatlan állapotúak; az őssejtek ezt a képességüket akár több ezer évig is képesek megőrizni (lásd *Sequoia sempervirens*, örökzöld mamutfenyő, Scheres 2007). Az őssejtek ritkán és többnyire aszimmetrikusan osztódnak, ami révén új sejtvonalak jönnek létre. Az utódsejtek akár többször is tovább osztódhatnak (ezek az ún. progenitor vagy tranzit amplifying sejtek), mielőtt kilépnének a sejtciklusból és differenciálódnának. Az őssejtek mind az állatokban, mind a növényekben speciális környezetbe ágyazódnak (ez az ún. stem cell niche vagy iniciális; 1. ábra). A differenciálatlan sejtek osztódási képessége között tehát különbségek vannak. Az osztódások számát és a sejtek méretét a növényekben is az egyedfejlődés genetikai programja írja elő, ezt azonban esetükben a környezeti változások

jelentősen befolyásolhatják, azok mintegy felülírhatják az adott genetikai programot (Scofield és Murray 2006). A bonsai növények jól példázzák, milyen drámai hatású lehet a környezet a növény végső méretére.

A növények és szerveik mérete elsősorban a sejtek számától és méretétől függ. A gyökér és a szár növekedése során az osztódás és a differenciálódás között egyensúlyi állapot jön létre. A folyamatosan növekvő *Arabidopsis* (lúdfű) gyökérmerisztéma mérete a csírázást követő néhány napban még növekszik, de ezt követően egy meghatározott méretnél stabilizálódik. Ezzel szemben egy determinált növekedésű szerv, mint amilyen a levél is, két egymástól elkülönülő fázisra oszlik: a kezdeti osztódást a sejtek megnyúlása követi (2. ábra). Ennek során a mitotikus sejtciklus endociklussá alakul. Az endociklusban a DNS szintetikus vagy S-fázisát nem követi mitotikus fázis, vagyis kromoszóma-duplikáció és -szegregáció, így a sejtek DNS-tartalma minden egyes endociklusban megduplázódik anélkül, hogy a kromoszómaszám megváltozna (2. ábra). A megemelkedett DNS-tartalom (ploidiaszint) növeli a sejtek méretét (Tsukaya 2008; 2013), bár pontosan nem ismert, milyen mechanizmus révén. Feltételezik, hogy a ploidiaszint emelkedése fokozza a sejtek szintetikus kapacitását, a nagyobb kópiaszám több fehérjét jelent. Ezt az elméletet azonban nemrégiben megcáfolták (Tsukaya 2013). Ugyan a ploidiaszint változása befolyásolhatja a sejt méretet, ennek mértéke azonban sokkal inkább genetikai faktoroktól, mint a ploidiaszinttől függ (Tsukaya 2013). A növényi szervek mérete azonban bizonyos határig követi a ploidiaszintben bekövetkezett változásokat: a tetraploid *Arabidopsis* (4C) növény sejtjei és szervei (levelei és virágai) is nagyobbak a diploid rokonnál (2. ábra). Az oktoploid (8C) növény azonban már lényegesen kisebbre nő a diploid növénynél annak ellenére, hogy a sejtjei nagyobbak (ez az ún. magas ploiditás szindróma). Ennek oka, hogy az oktoploid növény kevesebbet osztódik, azaz a ploidiaszint emelkedése egy bizonyos határ fölött már gátolja a sejtosztódást. Megfigyelések alapján az *Arabidopsis*-ban például a hexaploidszint még pozitív hatású a szervméretre (Tsukaya 2008). Ezzel összhangban a tetraploid *Arabidopsis* növény fejlődése lassabb, mint az azonos korú diploidé (Tsukaya 2008). A nagyobb DNS-méret lassabb sejtosztódási ciklust eredményez, ezáltal lelassul a tetraploid növény fejlődése.

A levelek mérete fajra specifikusan alakul ki; a közeli rokonok esetében, például az *Arabidopsis*-nál és a repcénél, a jelentős méretbeli különbségek háttérében elsősorban a sejtszám és nem a sejt méretbeli eltérések állnak (Anastasiou és Lenhard 2008; Bögre et al. 2008); a repce esetében a genetikai program több osztódást tesz lehetővé, mint amit az *Arabidopsis* genetikai programja megenged. Az ezért felelős molekuláris mechanizmus viszont még nem teljes egészében ismert. Az *Arabidopsis* cytochrome P450 családba tartozó egyik gén, a KLUH (a képregényhős, HULK megfordított nevéből; Anastasiou et al. 2007) fontos szerepet játszhat a szervek méretét meghatározó folyamatokban. A KLUH hiányában ugyanis kisebb, míg kissé megemelt expressziója mellett nagyobb levelek és virágok jönnek létre. A feltételezés szerint a KLUH egy eddig még nem azonosított mobilis növekedési faktort hoz létre. Különös módon azonban a KLUH kifejeződése a levelek és a virágszirmok peremére korlátozódik. Hogyan határozhatja meg mégis ez a szignál a szervek méretét? Geometriai okokból kifolyó-

lag a levél kerülete fele olyan lassan nő, mint a levél területe, így a mobilis növekedési faktor a kerület-terület aránynak megfelelően hígul ki, így határozva meg a fajra specifikus szerv méretét. Hasonló mechanizmus alakítja a *Drosophila* szárnyméretét is (Day és Lawrence 2000). Egy másik elképzelés szerint a növekedési faktor a levélnyélben keresztül jut a levéllemezbe, és alakít ki egy állandónak mondható osztódási zónát (Kazama et al. 2010, Adrianakaja et al. 2012; 2. ábra). A levél kiindulási stádiumában (primordium) még minden sejt része ennek a zónának, és itt osztódik. Néhány nap alatt azonban jelentősen megnő az osztódásból kilépő és megnyúló sejtek száma, míg végül a levél eléri azt a fejlődési pontot, amikor minden osztódás leáll (Adrianakaja et al. 2012). Érdekes módon, a sejtmeinyúlást megelőzi a kloroplasztiszok differenciálódása. A kloroplasztiszból jövő szignál, az ún. retrográd szignál gátlásával ugyanis a sejtek meinyúlását is gátolni lehet (Adrianakaja et al. 2012).

Nem minden levélsejt osztódása szabályozódik egyformán. A levélben szétszórtan előforduló zárósejt-merisztémoidok, a légcserenyílások (sztómák) zárósejtjeit létrehozó speciális levélőssejtek még javában osztódnak, amikor a szomszédos epidermális sejtek már rég kiléptek a sejtciklusból és endociklizálnak. A merisztémoidok és az epidermális sejtek osztódását tehát más mechanizmus szabályozza, de ennek termélete pontosan még nem ismeretes (Adrianakaja et al. 2012).

Néhány *Arabidopsis* gén pozitívan képes befolyásolni a szervek méretét, ilyen például az *Aintegumenta* (ANT) is, amely egy növény-specifikus transzkripciós faktort kódol (Mizukami és Fischer 2000). Az ANT túltermeltetése nagyobb, míg gátlása kisebb szervek kialakulásához vezet. Az ANT meghosszabbítja az osztódási fázist, azaz késlelteti a sejtek kilépését az osztódásból, ezzel növelve a sejtsszámot és így a szervek méretét. Bár a pontos molekuláris mechanizmusa nem ismert, a sejtosztódásban fontos szerepet játszó szabályozó ciklin D3;1 gén (lásd később) aktiválódását figyelték meg. Érdekes módon azonban a ciklin D3;1 túltermeltetése kisebb növényt eredményezett (Dewitte et al. 2003). Egy másik *Arabidopsis* gén, az EBP1 nemcsak az osztódást képes stimulálni, de a sejtek méretét is növeli (Horváth et al. 2006). Az EBP1 egy állati szabályozó fehérje közeli rokona, amely a riboszómák biogenezisében vesz részt, és ennek megfelelően a magvacskában található. Feltételezik, hogy a gén túltermeltetése fokozza a sejtek fehérjeszintetikus kapacitását, ami pozitívan hat a sejtosztódásra, és növeli a sejtek méretét. A fehérjeszintézis fokozása az állati és élesztősejtek osztódására is pozitív hatással van.

Az állatok esetében az extra sejtek keletkezése növeli a tumor kialakulásának kockázatát. A növények rendkívül jól képesek tolerálni a megnövekedett sejtsszámot; a keletkezett sejtöbbltet többnyire gond nélkül beépítik az adott szerv szöveteibe (Doerner et al. 1996; Doonan és Hunt 1996). Növényi tumor kialakulását csak néhány növénykórokozó-fertőzés során lehet megfigyelni (pl. az agrobaktérium-, illetve a geminivírus-fertőzés esetében; Gutzat et al. 2012).

Rendkívüli, hogy a sejtsszám csökkenésével párhuzamosan nagyobb sejtek kialakulását figyelték meg olyan *Arabidopsis* mutánsok levelében, ahol gátlódott a sejtosztódás. A levélsejtsszám csökkenéséből eredő méretbeli változást tehát, egy bizonyos határon belül, a sejtmeinyúlás kompenzálhatja (Hemerly et al. 1995; Tsukaya 2008; De Veylder

et al. 2001). A kompenzáció során nőhet a sejtek ploidiaszintje, ami az endociklus aktiválódására utal. A kompenzáció azt is jelenthetné, hogy a kevesebbet osztódó sejtek többet endoreduplikálódnak, megnő a ploidiaszintjük és azzal arányosan a méretük. Bizonyos esetekben azonban a sejtek a ploidiaszint emelkedése nélkül is képesek a megnyúlásra, azaz létezik egy endociklustól független megnyúlási mechanizmus (De Veylder et al. 2001; Magyar et al. 2012). A mitózisból az endociklusba történő átmenet azonban továbbra is meghatározó szerepet játszik a növényi szervek fejlődésében.

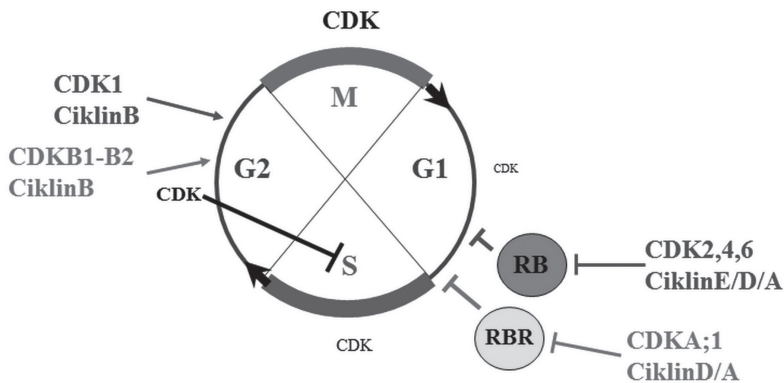
Az elsődleges növekedésszabályozás: a sejtosztódási ciklus

Az élővilágban a sejtciklus eseményei univerzálisnak tekinthetők, ezért nem meglepő, hogy a különböző eukarióta élőlények (a gombák, az állatok és a növények) sejtciklus-szabályozó molekulái nemcsak nagyon hasonlóak, de hasonlóképpen is működnek. A sejtciklus központi szabályozója egy kinázomolekula, amelyet ciklinfüggő protein-kináznak neveztek el (az angol neve – cyclin-dependent kinase – alapján rövidítve: CDK). A CDK működése ugyanis elsősorban a ciklinszabályozó molekuláktól függ, amelyek a sejtciklus során periodikusan jelennek meg, ciklizálnak. A CDK kináz egy biokémiai kapcsolónak tekinthető, amelynek mindössze két stabil állapota van: egy aktív és egy inaktív. Ezeknek az állapotoknak a kialakításáért komplex folyamatok a felelősek, a már említett ciklinmolekulák mellett a CDK-gátló fehérjék és a foszforilációs lépések együttesen vezetnek a be-, illetve kikapcsolódásához (Morgan 2007). A sejt az osztódási ciklus hibátlan működését az ún. kontrollpontokban ellenőrzi. A DNS-szintézis során bekövetkezett hiba megakadályozza a CDK aktiválódását, egészen addig gátolva ezzel a sejtciklus továbbhaladását, amíg a hibák ki nem javítódnak az ún. G2-M átmenet során. Hasonlóképpen, egy hibás mitotikus esemény, például a kromoszómák egyenlőtlen szétosztása, meggátolhatja a CDK inaktíválódását, ami késleltetni fogja az osztódásból történő kilépést. A kontrollpontok hibás molekuláris mechanizmusa mutációkhoz vezet, és ez akár végzetes következményekkel is járhat, akár rákos sejtburjánzást is előidézhet. Az élesztősejtekben egyetlen CDK-molekula vesz részt a sejtciklusfázisok koordinálásában, amely különböző fázisspecifikus ciklinmolekulákkal lép komplexbe. Az élesztőtől eltérően a magasabb rendű állatok és növények sejtjeiben egy több tagból álló CDK-kináz család található. Az *Arabidopsis* 12 CDK-rokon molekulával rendelkezik (CDKA-F), amelyek 8 alcsoportozáshoz tartoznak (Vandepoele et al. 2002; Magyar et al. 2013). Hasonló csoportosítás jellemzi a többi növényi fajt is, a rizshez hasonló egyszikűeket (Guo et al. 2007), az alacsonyabb rendű moszatokat, például a *Selaginellát* (Banks et al. 2011), de még a zöld algákat is (Bisova et al. 2005). A növényi CDK-molekulák közül csak a CDKA és a CDKB alcsoportba tartozóak vesznek közvetlenül részt a sejtosztódás szabályozásában (3. ábra). A növényekben egyetlen A-típusú CDK található (CDKA;1), és ez az egyedüli olyan növényi CDK, amely helyettesíteni képes az élesztő *cdc2* (CDK1) funkcióját a *cdc2* mutáns élesztősejtekben (Hirt et al. 1991). A CDKA;1 aktivitása a sejtosztódás során ciklizál, az S- és M-fázisba lépést megelőző kontrollpontokban aktiválódik (Magyar et

al. 1997). A jelenlegi modell szerint azonban a CDKA;1 főleg az osztódásba lépésben játszik meghatározó szerepet (Van Leene et al. 2011, Nowack et al. 2012), míg a G2-M fázisok szabályozása a növény-specifikus CDKB kinázokkal történik. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a CDKA;1 elsősorban az osztódásba lépés során szabályozó szerepet játszó ciklinszabályozó molekulákkal lép komplexbe, például a Ciklin D és a Ciklin A alcsalád tagjaival (Dewitte és Murray, 2003; Magyar et al. 2013; 3. ábra). Ezzel szemben a CDKB kinázok jellemző ciklinpartnerei a mitotikus ciklinek, a Ciklin B fehérjék. A CDKB1 (CDKB1;1, CDKB1;2) és CDKB2 (CDKB2;1 és CDKB2;2) alcsalád tagjai csak a növényekben fordulnak elő, és a késő S-fázistól kezdődően sejtciklus-specifikusan a G2- és M-fázisokban fejeződnek ki (Magyar et al. 1997; 3. ábra). A növényi CDKA;1 funkció teljes hiányában (homozigóta *cdka;1* mutáns) nem születnek új növények (Nowack et al. 2006), amiből arra lehetne következtetni, hogy CDKA;1 nélkül nincs sejtosztódás. A *cdka;1* mutáció befolyásolja az ivarsejtek, ezen belül is a növényi hímivarsejtek osztódását. A hiányos pollenosztódásnak köszönhetően elmarad a növényekre jellemző kettős megtermékenyítés, így nem alakulnak ki életképes magok. Nemrégiben sikerült az embrionális fejlődés során is tanulmányozni a CDKA;1 funkciót (Nowack et al. 2012). Meglepő módon a CDKA;1 hiányában sokkal kisebb és kevesebb, a kontrollhoz képest csak 10% sejtet tartalmazó, de életképes növényi embriókat kaptak. A CDKA;1 funkció nélkül ugyanakkor nem fejlődik ki gyökér, és steril virágok jönnek létre. A *cdka;1* mutánt a CDKB kinázokkal részlegesen komplementálni lehet, ami arra utal, hogy van némi funkcionális átfedés a két eltérő növényi CDK kináz között. A CDKB1 kinázok elsődleges szerepe a sejtciklus M-fázisához köthető, és a *cdkb1* funkció hiányában a zárósejtek kialakulásában szerepet játszó merisztematikus sejtek osztódása sérül (Boudolf et al. 2004). A CDKB2 kinázok szerepe a hajtásmerisztéma kialakulásában van (Andersen et al. 2008).

A növényekkel szemben az állati CDK1 kináz (az élesztő *cdc2* gén funkcionális homológja) főleg a G2-M átmenetet szabályozza, míg a G1-S átmenetben az ún. interfázis CDK molekulák (CDK2,4,6) szerepére van szükség (3. ábra). Az interfázis CDK kinázok szerepe azonban nem nélkülözhetetlen; nemrégiben olyan *cdk2,4,6* mutáns, ún. knock out egereket hoztak létre, amelyeknél a korai embrionális fejlődés furcsamód nem gátlódott, feltételezve, hogy egyetlen állati CDK-molekula (CDK1) képes szabályozni a sejtosztódást, legalábbis a korai, embrionális fejlődés során. Hasonlóképpen, az interfázis CDK kinázok ciklinpartnereinek mutációja sem gátolta az éger korai embrionális fejlődését (három Ciklin D, két Ciklin E; Sherr és Roberts 2004). Ez a modell hasonlít az élesztő sejtciklusához, ahol mindössze egyetlen CDK-molekulára van szükség a sejtciklus szabályozásához. Az élesztő *cdc2* (CDK1) különböző ciklinmolekulákkal lép komplexbe; a feltételezés szerint azonban a ciklinmolekulák nemcsak aktiválják a CDK-enzimet, de a szubsztrát specificitását is képesek befolyásolni, minőségi különbséget feltételezve az S- és M-fázisú ciklin-CDK komplexek között. Nemrégiben ezt az elméletet kísérletesen is letesztelték: az élesztő egyik mitotikus ciklin génjét (*cdc13*) egyesítették a *cdc2* molekulával (a kimérát a *cdc13* promótere irányította), majd mutációval inaktívtázták az egyetlen *cdc2* és az összes S- és M-fázisú élesztő ciklin gént, „magára hagyva” a mesterségesen létrehozott minimális sejtciklus

regulátort (Coudreuse és Nurse 2010). Meglepő módon azonban ez az egyetlen ciklin-cdc2 kiméraféhrje elegendőnek bizonyult a mutáns élesztő sejtciklusfázisainak hibátlan koordinálásához. Megállapították, hogy a sejtciklus szabályozása egyetlen ciklinmolekulával aktivált CDK-enzimmel is lehetséges; ez a CDK-aktivitás a ciklinfehérje szintézisének és lebontásának köszönhetően oszcillál, és a sejtciklusfázisok helyes sorrendjét a kináz abszolút aktivitásának mértéke biztosítja. Az osztódásba lépéshez így még alacsony CDK-aktivitásra van szükség, amely azonban az M-fázishoz érve jelentősen megnő, míg a mitózisból történő kilépéshez a CDK működését gátolni kell (3. ábra). A korábbi növényi és állati példák arra engednek következtetni, hogy ez a modell feltehetően az állatokra és a növényekre is érvényes. Ugyanakkor mind az állati, mind a növényi sejtciklus szabályozása összetett, pusztán az *Arabidopsis* mintegy száz sejtciklus-szabályozóval rendelkezik, ám érdekes módon az egyszikű rizsben csak feleannyi sejtciklus-regulátor található. Miért jött létre ez a komplexitás, ha a sejtosztódás szabályozása egyetlen CDK-ciklin molekulával is megoldható? A válasz minden bizonnyal a sejtek magasabb szerveződési szintjeinek – szöveteinek és szerveinek – kialakulásában keresendő, ahol a sejtosztódás szabályozása a fejlődési program ellen-



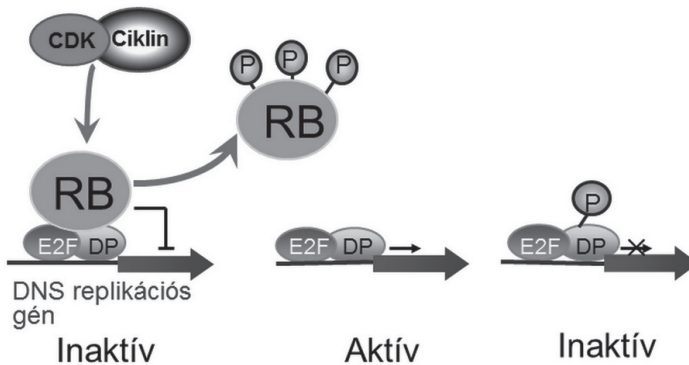
3. ábra. Az eukarióta mitotikus sejtciklus modellje. Az élesztő sejtciklus kutatások alapján a sejtosztódás fázisainak helyes sorrendjét egyetlen CDK-molekula képes biztosítani. A CDK-molekula működéséhez elegendő egyetlen ciklinmolekula (ciklinB), és a fázisok helyes sorrendjét és visszafordíthatatlanságát a kinázaktivitás erőssége határozza meg. A modellben a CDK aktivitások erősségét a CDK betűk mérete jelzi; a G2-fázisban a CDK-aktivitás gátolja az S-fázis ismétlődését (Coudreuse és Nurse 2010). Ez az alapmodell feltehetően igaz az állatokra és a növényekre is. A magasabb rendű szerveződési szintek – a szervek és szövetek – megjelenésével azonban az állati és a növényi sejtosztódás szabályozása is új komponensekkel bővült. Az állatok esetében a CDK1 a G2/M kontrollpont szabályozásában játszik meghatározó szerepet, míg a G1/S új, ún. interfázis CDK-kinázok által szabályozódik. A növények CDK1 kináza (CDKA;1) ezzel szemben főleg a G1/S kontrollt szabályozza, a G2/M kontroll szabályozásához új, növény-specifikus CDKB kinázok jöttek létre (CDKB1-B2). Az állati és növényi G1/S CDK kinázok fő szubsztrát fehérjéje a retinoblasztóma (RB), illetve ennek növényi megfelelője, a retinoblasztóma-rokon fehérje (retinoblastoma related protein, RBR; részletesebben az 5. és 10. ábrán)

őrzése alatt áll. Általánosságban elmondható, hogy egy kifejtett szövetben háromféle sejttípus található: az őssejtek (sztemsejtek), a progenitor, és a már differenciált sejtek (Burkhart és Sage 2008). A transzkripcionális szabályozás meghatározó szerepet játszik ezeknek a sejttípusoknak a kialakításában. A megújulásra képes őssejtekben gátlódik a differenciálódási program, de csak ritkán osztódnak, általában nyugalmi állapot jellemzi őket. A progenitor sejtek már elveszítették megújulási képességüket, de még aktívan osztódó sejtek, amelyek bizonyos szignálok hatására kilépnek az osztódásból és terminálisan differenciálódnak. A differenciált sejtek sem osztódnak, sem megújulni nem képesek. Hasonló sejttípusok alkotják a növények szöveteit is. Az már régóta tudott, hogy a differenciált növényi sejtek bizonyos szignálok hatására nemcsak az osztódási, de a megújulási képességüket is visszanyerhetik, például a szomatikus embriogenezisnél (Dudits et al. 1991). A legújabb állati eredmények alapján bizonyos transzkripciósi faktorok hatására a differenciált állati sejtek is képesek megújulni és osztódnak (Scheres 2007).

Mi szabályozza ezeket a különböző sejttípusokat? Mennyire hasonló és mennyiben eltérő szabályozási mechanizmusok vesznek részt az állatokban és a növényekben ezeknek az állapotoknak a kialakításában? Ezekre a kérdésekre nem igazán ismerjük a választ. Ráadásul, a növények helyhez kötött életmódjának köszönhetően a progenitor sejtek osztódását nemcsak a genetikai program, de a környezeti változások is szabályozzák. Éppen ezért nemcsak tudományos, de gazdasági szempontból is fontos lenne megérteni, hogy a környezeti szignálok milyen jelátviteli csatornákon keresztül érik el a sejtosztódás szabályozását.

Az osztódásba lépés szabályozása: az E2F-RB szabályozási mechanizmusa

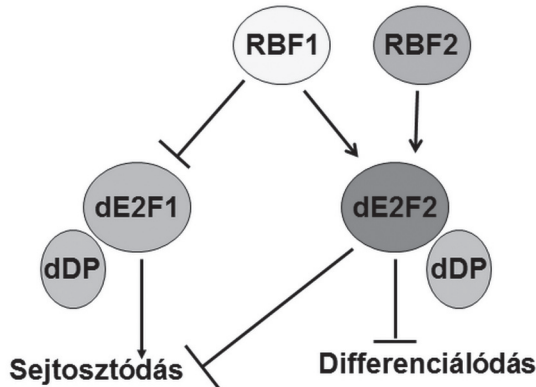
A növények növekedése a merisztéma működésétől függ: a sejtek osztódási képességétől, attól, hogy mennyit és meddig osztódnak, majd az osztódásból való kilépés után mikor kezdenek el differenciálódni. A jelenleg elfogadott modell szerint az osztódásba történő be- és kilépést egy evolúciósan konzerválódott transzkripcionális mechanizmus, az E2F-RB szabályozza (Inzé és De Veylder 2006; Magyar 2008). Bár a kezdeti eredmények alapján az E2F-RB fő funkciójaként a sejtosztódás szabályozása lett meghatározva, a későbbi eredmények kimutatták, hogy a differenciálódási és az apoptotikus (sejthalál) folyamatok szabályozásában is szerepet játszik. A *Retinoblasztóma* (RB) volt az első rákos sejtburjánzást gátló (tumorszupresszor) gén, amelyet emlőssejtekből izoláltak, míg az E2F (adenovírus E2 promóter binding factor) transzkripciósi faktort az RB fehérjével komplexet formáló képessége alapján azonosították (Bagchi et al. 1991; Rowland és Bernards 2006; van den Heuvel és Dyson 2008). Az E2F faktor emlőssejtkultúrában történő kifejeztetésével a növekedési hormon hiányában is osztódást lehetett indukálni (Johnson et al. 1993). Jó néhány évvel később növényi sejtekben is hasonló eredményt értek el, amikor az egyik *Arabidopsis* E2F rokon faktort túlermeltetve osztódást lehetett aktiválni a növényi növekedési hormon, az auxin hiányában (Magyar et al. 2005; 4. ábra).



5. ábra. A klasszikus E2F-RB modell. Nem osztódó sejtekben az RB az E2F transzkripció faktorhoz kötődik, és gátolja az S-fázisú gének aktiválódását. Mitogén stimulus hatására RB-kinázok (CDK-Ciklin) aktiválódnak, és az RB-t hiperfoszforilálják. A hiperfoszforilált RB szabadon engedi az E2F/DP heterodimért, amely aktiválja az S-fázisú géneket. A késői S-fázis alatt az E2F/DP foszforilálódás által elveszíti DNS-kötő képességét, és az S-fázisú gének kikapcsolódnak

Általánosságban elmondható, hogy mielőtt az E2F faktor a DNS-specifikus szekvencia elemeihez kötődne, komplexet, ún. heterodimért formál a dimerizációs partnerfehérjével (DP), amely hasonló szerkezetű, mint maga az E2F (lásd később). A modell szerint az E2F aktiválja az osztódásba lépéshez szükséges géneket. A kezdeti, elsősorban állati eredmények alapján az RB az E2F negatív szabályozója. Nem osztódó sejtekben az RB komplexet formál az E2F faktoral. Az E2F molekulában az RB-kötőhely a transzaktivációs doménben található, így az RB kötődése fizikailag gátolja az E2F működését. A növekedési hormonok és mitogének hatására az RB inaktiválódik. Kulcsszerepet játszanak ebben a folyamatban az RB-kinázok, a specifikus CDK-Ciklin D komplexek, amelyek az osztódásba lépés során aktiválódnak (ezek a korábban már említett interfázis CDK-enzimek; Sherr és Roberts 1999). Az RB-kinázok hiperfoszforilálják az RB fehérjét, amely konformációs változás hatására szabadon engedi az E2F heterodimért (E2F/DP). A szabad E2F/DP heterodimér aktiválja a DNS-szintézisben szerepet játszó géneket (pl. CDC6, ORC, RNR2 stb). Az S-fázisban CDK-Ciklin A kinázok aktiválódnak, amelyek gátolják az E2F/DP DNS-kötő képességét, ami az S-fázis specifikus génjeinek kikapcsolásához vezet (5. ábra).

Gyakorlatilag az összes emberi rákos megbetegedés közvetve vagy közvetlenül kapcsolatba hozható az RB hibás működésével. A kezdeti, ún. klasszikus modell viszonylag egyszerű magyarázatot adott arra, hogyan gátolja az RB a sejtosztódást, és az RB-funkció hiánya hogyan okozhat rákot. A későbbi kutatási eredmények azonban sokkal komplexebbé tették ezt a viszonylag egyszerű képet. Kiderült, hogy mind az RB, mind az E2F egy több tagból álló család része, ahol a különböző tagok funkciója eltér egymástól. A *Drosophila* (gyümölcslégy) esetében még egy viszonylag egy-



6. ábra. Egy új modell: az E2F-RB szabályozás *Drosophilában*. A *Drosophila* aktivátor dE2F1 transzkripció faktorja a klasszikus modell szerint működik (5. ábra). A represszor dE2F2 a *Drosophila*-gének két csoportját is gátolja; a nem osztódó sejtekben a sejtciklusgéneket (itt kompetícióban áll az aktivátor dE2F1-el), míg az osztódó sejtekben a differenciálódási géneket. Ezeket a géneket az RBF1-2 *Drosophila* RB rokon faktorokkal represszálja. Kimutatták, hogy ezek a komplexek MYB transzkripció faktorokat is tartalmaznak, és elnevezték őket DREAM komplexeknek (**DP-RBF-E2F2** and **MYB**). Hasonló fehérjekomplexeket tisztítottak más állati modellorganizmusokból is (Dimova et al. 2003)

szerűbb helyzet állt elő (6. ábra); itt összesen két E2F (dE2F1 és dE2F2) és egyetlen DP (dDP) alkotja az E2F-DP családot. A két *Drosophila* E2F funkciója egymástól eltérő; a dE2F1 egy transzkripcionális aktivátor, míg a dE2F2 egy transzkripcionális represszor. A dE2F1 hiányában lényegesen kisebb légylárvák fejlődnek, amit a másik dE2F2 mutációjával kompenzálni lehet (Frolov et al. 2001). A nem osztódó sejtekben a represszor dE2F2 a sejtosztódás elindításához szükséges génekhez kötődik, amit a dE2F1 szüntet meg, épp amikor az E2F specifikus promótereken lecseréli a represszort. Nem minden *Drosophila* E2F célgén szabályozódik azonban ilyenképpen. Osztódó sejtekben dE2F2- és dRBF- (a *Drosophila* RB rokonmolekulái) tartalmú multiprotein komplexeket mutattak ki (Dimova et al. 2003), amelyek nem a tradicionális módon, a hagyományos CDK-alapú RB-kinázok által szabályozódnak (Frolov et al. 2003). A komplex kialakulását gátolva olyan gének aktiválódását figyelték meg, amelyek nem a sejtosztódás szabályozásában vesznek részt, hanem a szövetspecifitás kialakításában és a differenciálódásban (Dimova et al. 2003). Ebből arra következtettek, hogy az osztódó sejtekben egy E2F-RB-tartalmú represszorkomplex formálódik, ami gátolja a differenciálódás idő előtti bekapcsolását. Ezt a komplexet a benne részt vevő komponensekről DREAM komplexeknek nevezték el (**DP-RBF-E2F2** and **Myb**). Hasonló összetételű E2F-RB-tartalmú represszor komplexeket mutattak ki gyakorlatilag az összes állati modellorganizmusból is (laboratóriumi fűg, egér és emberi sejtek), ami arra utal, hogy ez a komplex az evolúció során konzerválódott (van den Heuvel és Dyson 2008, Sadasivam és DeCaprio 2013).

A kezdeti eredmények azonban azt mutatják, hogy ez a komplex a különböző állati sejtekben eltérő funkciót tölt be.

Az emlőssejtekben nyolc E2F transzkripciósi faktort azonosítottak (E2F1-8), amelyek zöme represszorként funkcionál (E2F4-8). Ezeknek egy része RB-függő (E2F4-5), míg egy másik része RB-független módon gátol (E2F6-8). A transzkripcionális aktivátor E2F1-3 család tagjainak mutációja meglepő módon daganatos megbetegedések kialakulását eredményezte, amit nehéz összeegyeztetni a sejtosztódásban betöltött pozitív szerepükkel (Rowland és Bernards 2006). Kiderült, hogy az aktivátor E2F transzkripciósi faktorok hiányában az apoptotikus/sejthalál folyamatok sérülnek, ami bizonyos mutációk túléléséhez, és így tumor kialakulásához vezet. Kimutatták azt is, hogy az aktivátor és represszor E2F funkciók a sejtípustól függően változhatnak: az E2F1-3 bizonyos sejtekben (pl. az embrionális fibroblaszt sejtekben) aktivátorként, míg más sejtekben (a gyomorvékonybél vagy a retina sejtjeiben) represszorként funkcionál, és meghatározó szerepet játszik a differenciálódási program aktiválódásában (Danielian et al. 2008; Infante et al. 2008; Tsai et al. 2008; Chen et al. 2009; Chong et al. 2009; Wenzel et al. 2011). Az E2F aktivátor és represszor funkciója az RB jelenlététől függ; az E2F aktívan részt vehet az RB által irányított represszióban. Az RB ezzel egy időben nemcsak az RB-t a specifikus célgénhez vivő E2F fehérjéhez, hanem olyan enzimekhez is képes kötődni, amelyek megváltoztatják a kromatin szerkezetét. Ezek az ún. kromatin remodelling enzimek, ilyen például a hiszton deacetiláz, röviden HDAC, a hiszton metil-transzferáz, a SUV39H1, a DNS-metil-transzferáz, a DNMT1 és a heterochromatin protein 1, vagyis a HP1 (Burkhart és Sage 2008).

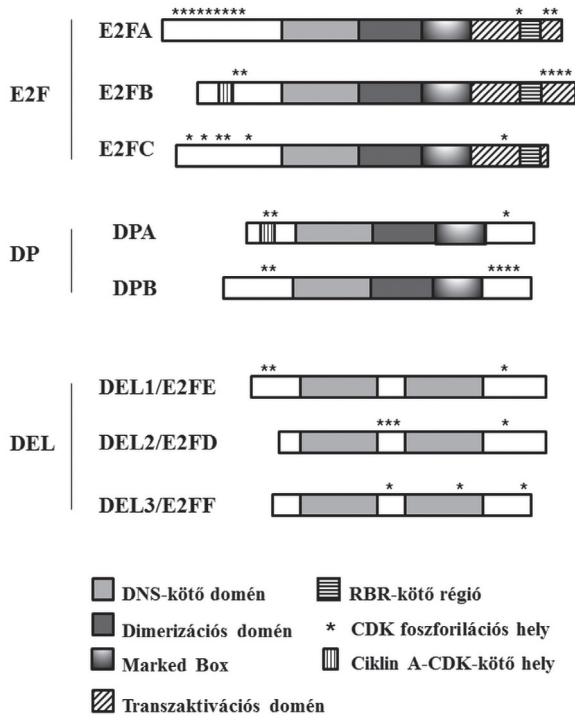
Az E2F-faktorok az S-fázisú gének szabályozása mellett a G2-M kontrollpontban szerepet játszó gének működését is szabályozzák, és a DNS-javítási folyamatokban részt vevő gének mellett a mitózisban szerepet játszó géneket is, például a mitotikus ciklinB1-et, a mitotikus checkpoint regulátor MAD2-t vagy a *Drosophila* CDC25 foszfatázt, amely a mitotikus CDK1 aktivátora. A tumorsejtekre jellemző a kromoszóma-rendellenességek gyakori előfordulása, a kromoszómavesztés (aneuploiditás) vagy a több kromoszóma (poliploiditás). Gyakori kérdés azonban, hogy melyik volt előbb, a kromoszóma-rendellenesség vagy a tumorsejt. A legújabb eredmények alapján az állati RB és az RB-rokon fehérjék, amelyből az emlőssejtekben további kettő található (a p107 és a p130), fontos szerepet játszanak a kromoszómák kondenzációjában, a mitotikus kromoszómák közti kohézió kialakításában, valamint a centromerek normális működésében is (Sage és Straight 2010). Ezeknek a folyamatoknak az ellenőrzése részben transzkripcionális szabályozás révén történik. Ennek megfelelően az E2F-RB számos olyan gén működését is szabályozza, amely a kromatin szerkezetét módosítja (ilyen például a hiszton H4 Lys 20 metilációjáért felelős SUV4-20H1 metiltranszferáz). Ezeknek a géneknek a hibás működése tehető felelőssé a kromoszóma-rendellenességek kialakulásáért. Ezzel összhangban, az RB hiányában a tumorsejtekhez hasonló mértékű kromoszóma-rendellenességet figyeltek meg. Fontos megemlíteni, hogy az RB közvetlenül is kölcsönhatásban áll számos, a kromatin szerkezetét befolyásoló fehérjével (pl. SUV4-20H1), DNS-javító enzimmel (BRCA1), sőt a kondenzinkomplexek komponenseivel is. Mindez felveti annak

lehetőségét, hogy az RB a kromoszómák szegregációját közvetlenül szabályozza. Az RB-funkció tehát a G1-S szabályozás mellett fontos szerepet játszik a G2-M kontrollpont szabályozásában is. Az RB hiányában a nyugvó sejtekben aktiválódik a sejtosztódás, és ezekben a sejtekben olyan kromoszóma-rendellenességek alakulnak ki, ami a tumor kialakulásának valóságos melegágya (Sage és Straight, 2010). Az RB-fehérje az emlőssejtekben több mint száz különböző fehérjével képes kölcsönhatásba kerülni. Bár az E2F fontos szerepet játszik az RB által irányított eseményekben, a kölcsönható fehérjék száma alapján az RB-molekulának minden bizonnyal E2F-független szabályozó szerepe is van. Ráadásul az RB-fehérjéről kimutatták, hogy nemcsak transzkripcionális, de poszttranszlációs eseményeket is képes szabályozni. Az RB kölcsönható partnerei között a fehérjelebontásban szerepet játszó komponenseket is kimutattak, ilyen például az APC (Anaphase Promoting Complex) és az SKP2 (S-phase Kinase Associated Protein 2). Az RB stimulálja az SKP2 degradációját, és ennek köszönhetően megnő a p27(Kip1) állati CDK inhibitor stabilitása, amely gátolja az interfázis CDK-Ciklin E komplex működését (Binné et al. 2007; Ji et al. 2004). Az RB a sejtosztódás gátlása mellett a differenciálódási folyamatokat is képes aktiválni. Az izomszövetben az RB kölcsönhatásban áll a MyoD transzkripciós faktortal, amely fontos szerepet játszik az izomsejtek differenciálódásában (Gutzat et al. 2012). Az RB gátolja az Eid1 gént, amely az izomdifferenciálódás gátló faktora, és ennek köszönhetően aktiválódik a p300 hiszton acetil-transzferáz, amely stimulálja a MyoD gén működését.

Az E2F-RB szabályozási mechanizmus meglepően jól konzerválódott a növényekben is, az egysejtes zöld algáktól kezdve egészen a magasabb rendű növényekig E2F- és RB-rokon géneket mutattak ki (Inze és De Veylder 2006; Lendvai et al. 2007; Gutzat et al. 2012). Az egysejtes, fotoszintézisre képes zöld alga (*Chlamydomonas reinhardtii*) egyetlen RB/MAT3, E2F- és DP-rokon molekulával rendelkezik (Bisova et al. 2005). Érdekes, ahogy az alga E2F-RB szabályozási mechanizmusa az algasejtek osztódási méretét szabályozza: az RB/MAT3 funkciójának hiányában az algák sokkal kisebb mérettel osztódnak, amit viszont az E2F1 és a DP1 mutációjával kompenzálni lehet (Fang et al. 2006; Umen és Goodenough 2001). Kivételesen a sejtosztódási gének expressziója nem változott lényegesen a *mat3/e2f1/dp1* mutáns sejtvonalakban, ráadásul a foszforilált alga RB fehérje képes volt komplexbe lépni az E2F-fel. Ez a komplex az osztódó algasejtekben is képes a DNS-hez kötődni. A *mat3* mutáns sejtek méretét ugyanakkor a transzkripció gátlásával nem lehetett helyreállítani, ezért feltételezik, hogy az RB-E2F szabályozási mechanizmus nem a transzkripcionális szabályozáson keresztül regulálja az algasejtek méretét. Nem minden állati RB-E2F vesz részt a sejtosztódás szabályozásában. A laboratóriumi féreg (*Caenorhabditis elegans*) egyetlen RB-, E2F- és DP-rokon molekulával bír, és a féreg RB-E2F mechanizmusa a fejlődési gének működését szabályozza (van den Heuvel és Dyson 2008).

Az *Arabidopsis* genom szekvenciájának ismeretében minden negyedik gén szabályozható az E2F transzkripciós faktorok által (Vandepoele et al. 2005). Ez a szám jóval meghaladja az emlős E2F célgének arányát (2%), és arra utal, hogy az E2F transzkripciós faktorok a sejtosztódás mellett a növényi életmód más folyamataiba

is beleszólhatnak. Az *Arabidopsis* egyetlen RB-rokon fehérjével (RBR), hat E2F molekulával és két DP (DPA-B) faktoriall rendelkezik (Magyar et al. 2000). Az RBR három E2F transzkripciósfaktorral képes komplexet alkotni (E2FA, E2FB és E2FC; Inzé és De Veylder 2006, Magyar 2008; 7. ábra). Ez a három *Arabidopsis* E2F transzkripciósfaktor hasonlít a legjobban az állati E2F1-5-rokon fehérjékhez, amelyek konzervált DNS-kötő doménnel rendelkeznek, a dimerizációs doménon keresztül DP fehérjékhez kapcsolódnak, valamint működő transzaktivációs és RBR-kötő doménjük is van. A három másik *Arabidopsis* E2F (DEL1-3; DP-E2F-szerű fehérje) csak a DNS-kötő doménben mutat hasonlóságot az E2F faktorokkal, ebből azonban mindjárt kettő is található bennük, még hozzá tandem pozícióban (7. ábra). A DEL transzkripciósfaktorok nem képesek sem transzaktiválni, sem pedig az RBR-rel kölcsönhatni. A DEL fehérjék ugyanakkor ugyanazokhoz a célgénekhez kötődhetnek, mint az E2F és az E2F-RBR komplexek, ezért feltételezhetően mind az aktivátor, mind a represszor E2F



7. ábra. Az *Arabidopsis* E2F és DP rokon fehérjék szerkezete. Három E2F (E2FA, E2FB, E2FC) rendelkezik a klasszikus E2F molekulákra jellemző minden szerkezeti adottsággal. Két DP (DPA és DPB) képes ezekkel az E2F faktorokkal dimért formálni. Három másik *Arabidopsis* E2F csak távoli rokonságban áll a többiekkel, ezeket DEL-nek nevezték el (**DP-E2F-Like**). Csillag jelzi a CDK foszforilációs helyeket (Magyar 2008)

komplexek természetes kompetitorai lehetnek. Az eddigi adatok alapján azonban a DEL funkció nem a sejtosztódás szabályozásában vesz részt, sokkal inkább a sejtmegegyülés és az endociklus regulációjában (Magyar 2008). Bár ezeket a regulátorokat először növényekből mutatták ki, később állati sejtekben is beazonosították őket (az emlőssejtekben az E2F7 és az E2F8). A szerepük azonban eltér a növényekben és az állatokban. Az *Arabidopsis* DEL1 gátolja az endociklust, míg az emlős E2F7 és E2F8 stimulálja (Vlieghe et al. 2005; Chen et al. 2012).

A három tradicionális *Arabidopsis* E2F faktor szerepe ugyanakkor a sejtosztódás szabályozásához és a merisztematikus funkciók kontrollálásához kapcsolható. Funkcionális jellemzésük alapján teljességgel különböző a szerepük. Az E2FA/DPA heterodimer túltermeltetése a sejtosztódást és az endociklust is aktiválta (De Veylder et al. 2002; Kosugi és Ohashi 2003), míg az E2FB/DPA túltermeltetése csak a mitózist stimulálta, ám az endociklust gátolta. Az E2FC és az E2FB szerepe ellentétes; az E2FC expressziójának az emelése az endociklust, míg csökkenése a mitotikus sejtciklust aktiválta (del Pozo et al. 2002; 2006). Keveset tudunk azonban e két antagonista E2F transzkripciófaktor célgenjeiről. A mitotikus ciklin B1;1 lehet az egyik közös célgén, amelynek az expresszióját mindkét E2F befolyásolhatja, bár egymással ellentétesen (del Pozo et al. 2006; Sozzani et al. 2006). A CYCB1;1 gén ugyan nem rendelkezik E2F-kötő szekvenciával, de az E2FC hiányában az összes gén közül a legjelentősebb aktivációt mutatta (del Pozo 2006). A CYCB1;1 indukcióját csak kifejlett levelekben figyelték meg, ami alapján feltételezik, hogy az E2FC differenciált levélsejtekben gátolja a sejtosztódást. A levélsejtek differenciálódása során a mitotikus sejtciklus endociklussá alakul át. Az E2FC funkció hiányában a levelek ploidiásintje csökkent, ami az endociklus gátlására utal. A *Drosophila* embriófejlődése során a mitotikus ciklin B1 és B3 gének a mitózisból az endociklusba történő átmenetben represszálódnak (Edgar és Orr-Weaver 2001). Ezzel összhangban, az *Arabidopsis* levélszórsejtjeiben, az ún. trichomákban, a ciklin B1;2 kifejeztetésével az endociklus mitotikus sejtciklussá konvertálható (Schnittger et al. 2002). Az E2FC azonban nemcsak gátolni, hanem aktiválni is képes (de Jager et al. 2009). Meglepetésre azonban a fotomorfogenezisben, a fényszignálban és a kloroplasztiszok működésében szerepet játszó gének aktiválódását figyelték meg az E2FC-t túltermelő növényekben (pl. HYH, CCA1, Chlorophyll A-B binding protein – de Jager et al. 2009). Érdekes módon a fény az E2FC és az E2FB fehérjék mennyiségére ellentétesen hat: sötétben az E2FC, míg fényben az E2FB fehérjék koncentrációja nő meg (Lopez-Juez et al. 2008). A fény az ubiquitin-SCF degradációs rendszeren keresztül stimulálja az E2FC fehérje lebontását (del Pozo et al. 2002). Fény jelenlétében aktiválódnak a merisztematikus folyamatok, míg a fény hiányában a sejtmegegyülés és az endociklus stimulálódik (Lopez-Juez et al. 2008). A fénytől függő módon az E2FC és az E2FB ellentétesen szabályozza a DEL1 működését. A DEL1 túltermeltetése gátolja, míg hiánya serkenti az endociklust (Vlieghe et al. 2005). Kimutatták, hogy a DEL1 szabályozza azoknak a Ccs52A géneknek a kifejeződését, amelyek a mitotikus ciklinek lebontásáért felelős Anaphase Promoting Complex (APC) aktivátorai (Lammens et al. 2008). Fény jelenlétében az E2FB kötődik a DEL1 gén promóterében található konszenzus E2F szekvenciaelemhez, és aktiválja

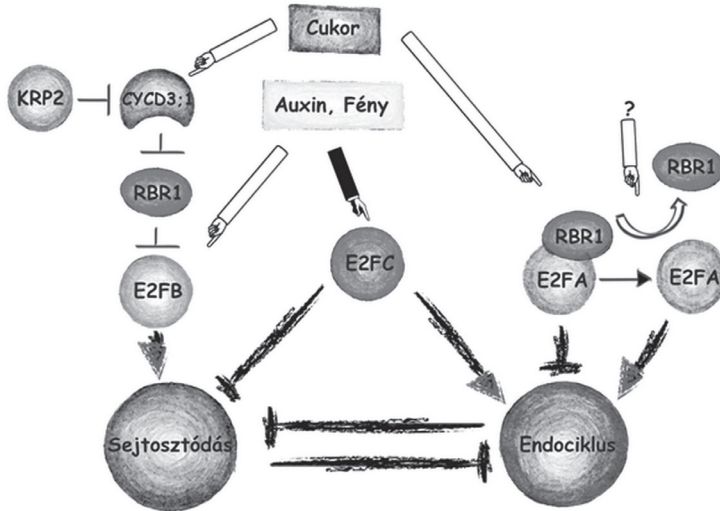
a DEL1 működését. Sötétben az E2FB destabilizálódik, míg az E2FC fehérje mennyisége megnő, és ez a DEL1 kifejeződését meggátolja (Berckmans et al. 2011).

Az auxin a dózistól függően sejtosztódást és sejtmegegyülést is képes indukálni: a magas auxinkoncentráció jelenlétében sejtosztódás, míg alacsony koncentráció esetén sejtmegegyülés észlelhető. Az auxin az E2FC fehérjét destabilizálja, míg az E2FB fehérjét megerősíti. Ezzel összhangban az E2FB/DPA heterodimer túltermeltetése auxin hiányában is sejtosztódást képes stimulálni (Magyar et al. 2005; 4. ábra). Mindezek alapján feltételezhető, hogy ennek a két antagonisztikus E2F transzkripciós faktornak a működése fontos szerepet játszik a növényi merisztéma működésében, a sejtosztódás és az endociklus közti egyensúly kialakításában.

Az E2FB túltermeltetése aktiválja a mitotikus CYCB1;1 és CDKB1;1 géneket (Sozzani et al. 2006; Magyar et al. 2005; Henriques et al. 2013). Az E2FB tehát nemcsak a G1-S, hanem a G2-M tranzíciós pont szabályozásában is fontos szerepet játszik. Ezzel összehangolva az *Arabidopsis* E2FB/DPA heterodimer túltermeltetésével a sejtek gyorsabban osztódnak, mert mind a G1-, mind pedig a G2-fázisok hossza lerövidül (Magyar et al. 2005). Ezek a transzgenikus sejtek ugyanakkor sokkal kisebb sejtmegegyüléssel lépnek be az osztódási ciklusba (Magyar et al. 2005). A sejtosztódás aktivitóját fedezhettük fel azokban a transzgenikus *Arabidopsis* levelekben is, ahol a saját expressziós doménjében fokozták az E2FB kifejeződését (8. ábra). Az extra sejtosztódások ellenére a kifejtett levelek kisebbre nőnek. Ez a jelenség eltér azokétól a transzgenikus növényekétől (pl. ANT, EBP1), ahol a sejtosztódás fokozásával a növényi szervek méretét is növelni lehet. Hogyan gátolhatja az E2FB a sejtmegegyülést? Nemrégiben mutatták ki, hogy az *Arabidopsis* S6K1 (riboszómás S6 kináz), amely egy evolúciósan konzerválódott, sejtmegegyülést szabályozó molekula, a növényekben az E2FB funkciójával ellentétes szerepet játszik (Henriques et al. 2010; 2013). Az S6K1 fehérje stimulálja az RBR és az E2FB kölcsönhatását (gátolva ezzel az E2FB transzaktivációs képességét), és egy ismeretlen mechanizmus révén destabilizálja az E2FB fehérjét. Hasonlóképpen, az E2FB is gátolja az S6K fehérje stabilitását és aktivitását is, feltételezve, hogy az E2FB az S6K funkciójának gátlásán keresztül represszálja a sejtek megegyülését.

Az E2FA funkcionális jellemzése alapján aktivátor és represszor E2F is lehet. Az E2FA/DPA túltermeltetése drámai mértékben gátolta a transzgenikus *Arabidopsis* növények fejlődését és növekedését (De Veylder et al. 2002). Bizonyos szövetekben a sejtosztódás, míg máshol az endociklus hiperaktiválódását lehetett tapasztalni. Az E2FA/DPA növények expressziós vizsgálatai alapján nemcsak a DNS-szintézisben szerepet játszó gének (pl. CDC6, ORC1, MCM3, RNR1), hanem a G2-M-fázisok szabályozásában részt vevő regulátorok (pl. CDKB1;1) aktiválódását is meg lehet figyelni. A géncsendesítés módszerével csökkentették az E2FA kifejeződését, aminek köszönhetően mind a mitózis, mind az endociklus aktivitása csökkent, megerősítve az E2FA kettős funkcióját (Magyar et al. 2012). Ráadásul, a levelek ploidiásintje jelentősen redukálódott az E2FA-RNS interferenciavonalak leveleiben. Hogyan aktiválhatja az E2FA ezeket az egymással ellentétes eseményeket? Az E2FA milyen tulajdonsága teszi képessé arra, hogy ugyanazon a szöveten belül az egyik sejtben még mitózist, míg a másikban

már endociklust aktiváljon? A legújabb eredmények meghökkentő válasszal szolgáltak. Kimutatták, hogy az RBR osztódó sejtekben képes az E2FA fehérjéhez kötődni, ami az aktív RBR-kinázok jelenléte miatt hihetetlennek tűnt. Ennek a komplexnek a kialakulása azonban a ciklin D3;1-et, a növényi RBR-kináz szabályozó ciklin alegységét túlermelő növényben sem gátlódott. Ugyanitt az E2FB-RBR komplex jelenlétét viszont nem lehetett kimutatni. Egy deléciós E2FA mutáns túlermeltesével gátolni lehetett az E2FA-RBR komplex kialakulását, ami az endociklus hiperaktivációjához vezetett. Feltételezése szerint az E2FA-RBR olyan represszorkomplexet formál, amely osztódó sejtekben gátolja az endociklus aktiválódásában szerepet játszó géneket, például a Ccs52A1-2, APC-aktivátorokat. Ennek megfelelően az RBR kötésben mutáns E2FA (E2FA^{ΔRBR}) növényekben a Ccs52A gének aktiválódtak. Egy egyelőre még nem tisztázott mechanizmus hatására az E2FA-RBR komplex destabilizálódik, és az E2FA komplexből kilépve aktiválja az endociklust.



10. ábra. A növényi E2F-RBR modell. A retinoblasztóma (RBR) fehérje a tápanyag (cukor) jelenlététől függően foszforilálódik; cukor hiányában a CDK inhibitor fehérje a KRP2 (Kip-related protein 2) gátolja az RBR-kinázt (CDKA;1), míg a cukor stimulálja a ciklinD3;1 (CYCD3;1) kifejeződését, és ez aktiválja az RBR1 foszforilációját. Az E2FB felszabadul az RBR gátlás alól, és aktiválja a sejtek osztódásba lépését. Az auxin és a fény ellentétesen szabályozza az aktivátor E2FB és a represszor E2FC fehérjeszinteket. Szemben az E2FB-vel, az E2FA cukor jelenlétében lép komplexbe az RBR1 fehérjével. Ez a represszor komplex gátolja azokat a géneket, amelyek az endociklus bekapcsolásáért felelősek, egyúttal tehát a differenciálódási program aktiválódását is. Egy még nem felderített mechanizmus által az E2FA-RBR1 komplex komponenseire esik szét, és az RBR-től mentes szabad E2FA aktiválja az endociklust. A nyilak aktivációt, a kalapácsok repressziót, a fehér karok stimuláló, a fekete karok pedig gátló szignálokat jeleznek (Magyar et al. 2013)

Az E2FA és az E2FB fehérjék gyökérmerisztematikus megjelenése az RBR fehérjével szövetspecifikus kölcsönhatást feltételez (9. ábra). Az RBR fehérje egyenletesen magas szinten fejeződik ki, szemben a két E2F fehérjével: az E2FA elsősorban az osztódó, merisztematikus sejtekben, míg az E2FB a posztmitotikus sejtekben detektálható nagyobb mennyiségben. Ez a modell feltételezi, hogy az *Arabidopsis* RBR a különböző E2F transzkripciósfaktorokkal komplexben különböző folyamatokat szabályoz (10. ábra). Nem mutatnak ugyanakkor sejtosztódási és fejlődési rendellenességeket azok a mutáns *Arabidopsis* növények, amelyekből hiányzik az E2FA vagy az E2FB funkció. A fentiek alapján feltételezhető, hogy az E2FA és az E2FB helyettesíteni tudja egymás funkcióját. Ennek megfelelően a mindkét E2F-re mutáns *Arabidopsis* növény nem életképes.

Hasonlóképpen, az *Arabidopsis rbr* mutáns sem az, hiszen az RBR által irányított represszió hiányában az ivarsejtekben osztódási rendellenességek figyelhetőek meg (Ebel et al. 2004). Nemrégiben azt is megfigyelték, hogy az RBR szabályozó funkcióra a meiotikus osztódásban is szükség van (Chen et al. 2011). Az RBR hiányában a homológ kromoszómák között nem történik rekombináció, és kromoszóma-rendellenességek kialakulását is fel lehetett fedezni. Az osztódások hiperaktivációjához az vezetett, hogy az RBR-funkciót a vegetatív növekedési fázisban gátolták (Park et al. 2005; Desvoves et al. 2006; Borghi et al. 2010). Az RBR túltermeltetése ugyanakkor a hajtás- és gyökérmerisztémák differenciálódását okozta (Wildwater et al. 2005; Wyrzykowska et al. 2006).

Az RBR szerepére nagy szükség van a sejtciklus G2-M fázisaiban, ugyanis az RBR expresszióját csökkentve a levélsejtek G2-M-specifikus gátlását figyelték meg (Borghi et al. 2010). Hasonló eredményt kaptak *Arabidopsis* sejtuszupenzióban is. Ezzel összhangban a növényi RBR funkcióra a korrekt kromoszómaszám fenntartásához is szükség van, akárcsak az állati sejtek esetében (Henriques et al. 2010; Johnston et al. 2010).

Kimutatták, hogy az RBR az őssejtek működésében is fontos szerepet játszik. Az RBR funkció gátlása növelte az osztódási aktivitást a gyökér őssejtrégiójában, bár a sejtciklus hossza változatlan maradt (Wildwater et al. 2005). Hasonló hatást lehetett elérni a Ciklin D, az E2FA/DPA vagy az E2FB/DPA heterodimérek túltermeltetésével is, ami arra utal, hogy az őssejtek osztódása a klasszikus CyCD/RBR/E2F mechanizmussal szabályozódik (5. ábra). Az RBR hiányában a gyökérmerisztéma-organizátor, a quiescence centre (QC; 1. ábra) nyugvó központ sejtjei is sűrűbben és aszimmetrikusan osztódnak (Cruz-Ramírez et al. 2012). Érdekes módon az RBR a QC sejtek osztódását nem az E2F faktorok, hanem a Scarecrow (SCR) transzkripciósfaktor működésén keresztül szabályozza. Az RBR és az SCR közötti kölcsönhatást gátolva a QC sejtek asszimmetrikus osztódása következett be. A QC sejtek osztódása a gyökérmerisztéma integritását ugyan nem változtatta meg, de a DNS-stresszre érzékenyebbé váltak.

Az RBR szerepére szükség van az embrionális állapotból a vegetatív állapotba történő átmenethez is (Gutzat et al. 2012). RBR hiányában az *Arabidopsis* embrió nem képes vegetatív állapotba jutni, és az embrionális levelekben a cukor jelenlétében kontrollálatlan osztódások indukálódnak. Az embrionális állapotra jellemző gének

(pl. ABI3 és LEC2) expressziója az RBR hiányában nem gátlódik. Ezeknek a géneknek a gátlásáért az evolúciósan konzerválódott polycomb represszor komplexek (PRC) a felelősek. Ezek a PRC komplexek a kromatin szerkezetét képesek befolyásolni. Az RBR hiánya gátolta az ABI3 gén metilációját, és ennek alapján feltételezhető, hogy az RBR és a PRC komplexek egymással kooperálhatnak (Gutzat et al. 2012).

Az *Arabidopsis* egyetlen RBR-rokon génnel rendelkezik, míg az egyszikűekben két RBR található (Lendvai et al. 2007). A két egyszikű RBR funkcionálisan eltérhet egymástól; a rizs OsRBR1 elsősorban fiatal, még osztódó levelekben fejeződik ki, míg kifejlett levelekben az OsRBR2 a domináns rizs RBR.

Az RBR és az E2F közti kölcsönhatást elsősorban a CDK-alapú RBR kinázok szabályozzák. A legújabb adatok szerint a CDKA;1 az elsődleges RBR kináz, ugyanis az *Arabidopsis*-ban az rbr mutációja helyreállítja a *cdka;1* mutációja által okozott rendelkezéseket (Nowack et al. 2012). Az asszimmetrikusan osztódó gyökérsejtekben azonban a CDKB1;1-ciklin D6;1 komplex RBR kinázként képes működni (Cruz-Ramirez et al. 2012). Nemrégiben azt is kimutatták, hogy az RBR fehérjét nemcsak CDK kinázok képesek foszforilálni (Popescu et al. 2009; Henriques et al. 2013). A hagyományostól eltérő RBR kinázok különböző stresszjelátviteli folyamatokban vesznek részt. A korábban már említett S6K1 tápanyaghiányos körülmények között aktiválódik. Az S6K1 RBR kötésre alkalmas doménnel rendelkezik, és *in vitro* foszforilálni is képes az RBR fehérjét. Feltételezik, hogy ez a foszforiláció erősíti az RBR sejtosztódást gátló aktivitását (Henriques et al. 2010; 2013). *In vitro* az MPK kinázok (MPK5 és MPK6) is képesek az RBR fehérjét foszforilálni (Popescu et al. 2009). Az MPK kinázok evolúciósan konzerválódott enzimek, amelyek számos stresszhelyzetben aktiválódnak (ozmotikus, szárazság, mechanikai stb). Az, hogy miképp befolyásolják ezek a foszforilációs lépések az RBR funkcióját, még nem ismert.

Felhasznált irodalom

- Anastasiou, E.–Lenhard, M. (2008) Control of plant organ size In: Bogre, L.–Beemster, G. T. (eds) *In Plant Growth Signaling*. Springer, Berlin–Heidelberg, 25–45.
- Anastasiou, E.–Kenz, S.–Gerstung, M.–MacLean, D.–Timmer, J.–Fleck, C.–Lenhard, M. (2007) Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Dev Cell* 13: 843–856.
- Andersen, S. U.–Buechel, S.–Zhao, Z.–Ljung, K.–Novák, O.–Busch, W.–Schuster, C.–Lohmann, J. U. (2008) Requirement of B2-type cyclin-dependent kinases for meristem integrity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 88–100.
- Andriankaja, M.–Dhondt, S.–De Bodt, S.–Vanhaeren, H.–Coppens, F.–De Milde, L.–Muhlenbock, P.–Skirycz, A.–Gonzalez, N.–Beemster, G. T.–Inze, D. (2012) Exit from proliferation during leaf development in *Arabidopsis thaliana*: A not-so-gradual process. *Dev Cell* 22: 64–78.
- Bagchi, S.–Weinmann, R.–Raychaudhuri, P. (1991) The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell*, 65: 1063–1072.

- Banks, J. A.–Nishiyama, T.–Hasebe, M.–Bowman, J. L.–Gribskov, M.–dePamphilis, C.–Albert, V. A.–Aono, N.–Aoyama, T.–Ambrose, B. A. et al. (2011) The *Selaginella* genome identifies genetic changes associated with the evolution of vascular plants. *Science* 332: 960–963.
- Berckmans, B.–Lammens, T.–Van Den Daele, H.–Magyar, Z.–Bogre, L.–De Veylder, L. (2011) Light-dependent regulation of DEL1 is determined by the antagonistic action of E2Fb and E2Fc. *Plant Physiol* 157: 1440–1451.
- Binné, U. K.–Classon, M. K.–Dick, F. A.–Wei, W.–Rape, M.–Kaelin, W. G., Jr.–Näär, A. M.–Dyson, N. J. (2007) Retinoblastoma protein and anaphase-promoting complex physically interact and functionally cooperate during cell-cycle exit. *Nat Cell Biol* 9: 225–232.
- Bisova, K.–Krylov, D. M.–Umen, J. G. (2005) Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 137: 475–491.
- Bögge, L.–Magyar, Z.–Lopez-Juez, E. (2008) New clues to organ size control in plants. *Genome Biol* 9: 226.1–6.
- Borghi, L.–Gutzat, R.–Futterer, J.–Laizet, Y.–Hennig, L.–Gruissem, W. (2010) *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA-RELATED is required for stem cell maintenance, cell differentiation, and lateral organ production. *Plant Cell* 22: 1792–1811.
- Boudolf, V.–Barroco, R.–de Almeida Engler, J., Verkest, A.–Beeckman, T.–Naudts, M.–Inzé, D.–DeVeylder, L. (2004) B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16: 945–955.
- Burkhart, D. L.–Sage, J. (2008) Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev* 8: 671–682.
- Chen, H. Z.–Tsai, S. Y.–Leone, G. (2009) Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat Rev Cancer* 9: 785–797.
- Chen, Z.–Higgins, J. D.–Hui, J. T.–Li, J.–Franklin, F. C.–Berger, F. (2011) Retinoblastoma protein is essential for early meiotic events in *Arabidopsis*. *EMBO J* 30: 744–755.
- Chen, H. Z.–Ouseph, M. M.–Li, J.–Pécot, T.–Chokshi, V.–Kent, L.–Bae, S.–Byrne, M.–Duran, C.–Comstock, G.–Tripathi, P.–Mair, M.–Senapati, S.–Martin, C. K.–Gandhi, S.–Wilson, N.–Liu, B.–Huang, Y. W.–Thompson, J. C.–Raman, S.–Singh, S.–Leone, M.–Machiraju, R.–Huang, K.–Mo, X.–Fernandez, S.–Kalaszczynska, I.–Wolgemuth, D. J.–Sicinski, P.–Huang, T.–Jin, V.–Leone, G. (2012) Canonical and atypical E2Fs regulate the mammalian endocycle. *Nat Cell Biol* 14: 1192–1202.
- Chong, J. L.–Wenzel, P. L.–Saenz-Robles, M. T.–Nair, V.–Ferrey, A.–Hagan, J. P.–Gomez, Y. M.–Sharma, N.–Chen, H. Z.–Ouseph, M.–Wang, S. H.–Tripathi, P.–Culp, B.–Mezache, L.–Winton, D. J.–Sansom, O. J.–Chen, D.–Bremner, R.–Cantalupo, P. G.–Robinson, M. L.–Pipas, J. M.–Leone, G. (2009) E2f1–3 switch from activators in progenitor cells to repressors in differentiating cells. *Nature* 462: 930–934.
- Coudreuse, D.–Nurse, P. (2010) Driving the cell cycle with a minimal CDK control network. *Nature* 468: 1074–1079.
- Cruz-Ramírez, A.–Díaz-Triviño, S.–Blilou, I.–Grieneisen, V. A.–Sozzani, R.–Zamioudis, C.–Miskolczi, P.–Nieuwland, J.–Benjamins, R.–Dhonukshe, P.–Caballero-Pérez, J.–Horvath, B.–Long, Y.–Mähönen, A. P.–Zhang, H.–Xu, J.–Murray, J. A.–Benfey, P. N.–Bako, L.–Marée,

- A. F.–Scheres, B. (2012) A bistable circuit involving Scarecrow-Retinoblastoma integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150: 1002–1015.
- Danielian, P. S.–Friesenhahn, L. B.–Faust, A. M.–West, J. C.–Caron, A. M.–Bronson, R. T.–Lees, J. A. (2008) E2f3a and E2f3b make overlapping but different contributions to total E2f3 activity. *Oncogene* 27: 6561–6570.
- Day, S. L.–Lawrence, P. A. (2000) Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* 127: 2977–2987.
- Desvoyes, B.–Ramirez-Parra, E.–Xie, Q.–Chua, N. H. and Gutierrez, C. (2006) Cell type-specific role of the retinoblastoma/E2F pathway during Arabidopsis leaf development. *Plant Physiol* 140: 67–80.
- Dewitte, W.–Murray, J. A. (2003) The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* 54: 235–264.
- Dewitte, W.–Riou-Khamlichi, C.–Scofield, S.–Healy, J. M.–Jacqmard, A.–Kilby, N. J.–Murray, J. A. (2003) Altered cell cycle distribution, hyperplasia and inhibited differentiation in Arabidopsis caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* 15: 79–92.
- Dimova, D. K.–Stevaux, O.–Frolov, M. V.–Dyson, N. J. (2003) Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the Drosophila E2F/RB pathway. *Genes Dev* 17: 2308–2320.
- Doerner, P.–Jorgensen, J. E.–You, R.–Steppuhn, J.–Lamb, C. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380: 520–523.
- Doonan, J.–Hunt, T. (1996) Why don't plants get cancer? *Nature* 380: 481–482.
- Dudits, D.–Bögge, L.–Györgyey, J. (1991) Molecular and cellular approaches to the analyses of plant embryo development from somatic cells in vitro. *J Cell Sci* 99: 473–482.
- Ebel, C.–Mariconti, L.–Gruissem, W. (2004) Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* 429: 776–780.
- Edgar, B. A.–Orr-Weaver, T. L. (2001) Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105: 297–306.
- Fang, S. C.–de los Reyes, C.–Umen, J. G. (2006) Cell size checkpoint control by the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *PLoS Genet* 2: e167.
- Frolov, M. V.–Huen, D. S.–Stevaux, O.–Dimova, D.–Balczarek-Strang, K.–Elsdon, M.–Dyson, N. J. (2001) Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev* 15: 2146–2160.
- Frolov, M. V.–Stevaux, O.–Moon, N. S.–Dimova, D.–Kwon, E. J.–Morris, E. J.–Dyson, N. J. (2003) G1 cyclin-dependent kinases are insufficient to reverse dE2F2-mediated repression. *Genes Dev* 17: 723–728.
- Guo, J.–Song, J.–Wang, F.–Zhang, X. S. (2007) Genome-wide identification and expression analysis of rice cell cycle genes. *Plant Mol Biol* 64: 349–360.
- Gutzat, R.–Borghi, L.–Fütterer, J.–Bischof, S.–Laizet, Y.–Hennig, L.–Feil, R.–Lunn, J.–Gruissem, W. (2011) RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN controls the transition to autotrophic plant development. *Development* 138: 2977–2986.
- Gutzat, R.–Borghi, L.–Gruissem, W. (2012) Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends in Plant Science* 17: 139–148.

- Hemerly, A.–De Almeida Engler, J.–Bergounioux, C.–Van Montagu, M.–Engler, G.–Inze, D.–Ferreira, P. (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J* 14: 3925–3936.
- Henriques, R.–Magyar, Z.–Monardes, A.–Khan, S.–Zalejski, C.–Orellana, J.–Szabados, L.–De la Torre, C.–Koncz, C.–Bogre, L. (2010) *Arabidopsis* S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1-E2F pathway activity. *EMBO J* 29: 2979–2993.
- Henriques, R.–Magyar, Z.–Bogre, L. (2013) S6K1 and E2FB are in mutually antagonistic regulatory links controlling cell growth and proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav* 8: 6.
- Hirt, H.–Pay, A.–Gyorgyey, J.–Bako, L.–Nemeth, K.–Bogre, L.–Schweyen, R. J.–Heberle-Bors, E.–Dudits, D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1636–1640.
- Horvath, B.–Magyar, Z.–Zhang, Y.–Hamburger, A. W.–Bako, L.–Visser, R. G.–Bachem, C. W.–Bogre, L. (2006) EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *EMBO J* 25: 4909–4920.
- Infante, A.–Laresgoiti, U.–Fernandez-Rueda, J.–Fullaondo, A.–Galan, J.–Diaz-Uriarte, R.–Malumbres, M.–Field, S. J.–Zubiaga, A. M. (2008) E2F2 represses cell cycle regulators to maintain quiescence. *Cell Cycle* 7: 3915–3927.
- Inze, D.–De Veylder, L. (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* 40: 77–105.
- Ji, P.–Jiang, H.–Rekhtman, K.–Bloom, J.–Ichetovkin, M.–Pagano, M.–Zhu, L. (2004) An Rb-Skp2-p27 pathway mediates acute cell cycle inhibition by Rb and is retained in partial-penetrance Rb mutant. *Mol Cell* 16: 47–58.
- Johnson, D. G.–Schwarz, J. K.–Cress, W. D.–Nevins, J. R. (1993) Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S-phase. *Nature* 365: 349–352.
- Johnston, A. J.–Kirioukhova, O.–Barrell, P. J.–Rutten, T.–Moore, J. M.–Baskar, R.–Grossniklaus, U.–Gruissem W. (2010) Dosage-sensitive function of retinoblastoma related and convergent epigenetic control are required during the *Arabidopsis* life cycle. *PLoS Genet* 6: e1000988.
- Kazama, T.–Ichihashi, Y.–Murata, S.–Tsukaya, H. (2010) The mechanism of cell cycle arrest front progression explained by KLUH/CYP78A5-dependent mobile growth factor in developing leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 51: 1046–1054.
- Kosugi, S.–Ohashi, Y. (2003) Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol* 132: 2012–2022.
- Lammens, T.–Boudolf, V.–Kheibarshekan, L.–Zalmas, L. P.–Gaamouche, T.–Maes, S.–Vanstraelen, M.–Kondorosi, E.–La Thangue, N. B.–Govaerts, W.–Inze, D.–De Veylder, L. (2008) Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14721–14726.
- Lendvai, A.–Pettko-Szandtner, A.–Csordas-Toth, E.–Miskolczi, P.–Horvath, G. V.–Gyorgyey, J.–Dudits, D. (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot* 58: 1663–1675.

- Lopez-Juez, E.–Dillon, E.–Magyar, Z.–Khan, S.–Hazeldine, S.–de Jager, S. M.–Murray, J. A.–Beemster, G. T.–Bogre, L.–Shanahan, H. (2008) Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 947–968.
- Magyar, Z.–Mészáros, T.–Miskolczi, P.–Deák, M.–Fehér, A.–Brown, S.–Kondorosi, E.–Athanasiadis, A.–Pongor, S.–Bilgin, M.–Bakó, L.–Koncz, C.–Dudits, D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* 9: 223–235.
- Magyar, Z.–Atanassova, A.–De Veylder, L.–Rombauts, S.–Inze, D. (2000) Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 486: 79–87.
- Magyar, Z.–De Veylder, L.–Atanassova, A.–Bako, L.–Inze, D.–Bogre, L. (2005) The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* 17: 2527–2541.
- Magyar, Z. (2008) Keeping the balance between proliferation and differentiation by the E2F transcriptional regulatory network is central to plant growth and development. In: Bogre, L.–Beemster, G. T. (eds) *In Plant Growth Signaling*. Springer, Berlin–Heidelberg, 89–107.
- Magyar, Z.–Horvath, B.–Khan, S.–Mohammed, B.–Henriques, R.–De Veylder, L.–Bako, L.–Scheres, B.–Bogre, L. (2012) *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J* 31(6): 1480–1493.
- Magyar, Z.–Ito, M.–Binarova, P.–Mohamed, B.–Bogre, L. (2013). Cell Cycle Modules in Plants for Entry into Proliferation and for Mitosis. In: Leitch, I. J.–Greilhuber, J.–Dolezel, J.–Wendel, J. (eds) *Plant Genome Diversity*. Vol. 2. Springer, Wien, 77–97.
- Mizukami, Y.–Fischer, R. L. (2000) Plant organ size control: Aintegumenta regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 942–947.
- Morgan, D. O. (2007) The Cell Cycle: Principles of Control. In: Lawrence, E. (ed.) *Primers in Biology*. Oxford University Press–New Science Press, London, 1–269.
- Nowack, M. K.–Grini, P. E.–Jakoby, M. J.–Lafos, M.–Koncz, C.–Schnittger, A. (2006) A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nat Genet* 38: 63–67.
- Nowack, M. K.–Harashima, H.–Dissmeyer, N.–Zhao, X.–Bouyer, D.–Weimer, A. K.–De Winter, F.–Yang, F.–Schnittger, A. (2012) Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 22: 1030–1040.
- Park, J. A.–Ahn, J. W.–Kim, Y. K.–Kim, S. J.–Kim, J. K.–Kim, W. T.–Pai, H. S. (2005) Retinoblastoma protein regulates cell proliferation, differentiation, and endoreduplication in plants. *Plant J* 42: 153–163.
- Popescu, G. V.–Bachan, S.–Zhang, Z.–Gerstein, M.–Snyder, M.–Dinesh-Kumar, S.-P. (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* 23: 80–92.
- del Pozo, J. C.–Boniotti, M. B.–Gutierrez, C. (2002) *Arabidopsis* E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF (AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14: 3057–3071.

- del Pozo, J. C.–Diaz-Trivino, S.–Cisneros, N.–Gutierrez, C. (2006) The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 18: 2224–2235.
- Rowland, B. D.–Bernards, R. (2006) Re-evaluating cell-cycle regulation by E2Fs. *Cell* 127: 871–874.
- Sadasivam, S.–DeCaprio, J. A. (2013) The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer* 13: 585–595.
- Sage, J.–Straight, A. F. (2010) RB's original CIN? *Genes Dev* 24: 1329–1333.
- Scheres, B. (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 345–354.
- Schnittger, A.–Schobinger, U.–Stierhof, Y. D.–Hulskamp, M. (2002) Ectopic B-type cyclin expression induces mitotic cycles in endoreduplicating Arabidopsis trichomes. *Curr Biol* 12: 415–420.
- Scofield, S.–Murray, J. A. (2006) The evolving concept of the meristem. *Plant Mol Biol* 60: V–VII.
- Sherr, C. J.–Roberts, J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501–1512.
- Sherr, C. J.–Roberts, J. M. (2004) Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 18: 2699–2711.
- Sozzani, R.–Maggio, C.–Varotto, S.–Canova, S.–Bergounioux, C.–Albani, D.–Cella, R. (2006) Interplay between Arabidopsis activating factors E2Fb and E2Fa in cell cycle progression and development. *Plant Physiol* 140: 1355–1366.
- Tsai, S. Y.–Opavsky, R.–Sharma, N.–Wu, L.–Naidu, S.–Nolan, E.–Feria-Arias, E.–Timmers, C.–Opavska, J.–De Bruin, A.–Chong, J. L.–Tripathi, P.–Fernandez, S. A.–Stromberg, P.–Rosol, T. J.–Leone, G. (2008) Mouse development with a single E2F activator. *Nature* 454: 1137–1141.
- Tsukaya, H. (2008) Controlling size in the multicellular organs: focus on the leaf. *PLoS Biol* 6(7): e174.
- Tsukaya, H. (2013). Does Ploidy Level Directly Control Cell Size? Counterevidence from Arabidopsis Genetics. *PLoS One* 8(12): e83729.
- Umen, J. G.–Goodenough, U. W. (2001) Control of cell division by a retinoblastoma protein homolog in Chlamydomonas. *Genes Dev* 15: 1652–1661.
- van den Heuvel, S.–Dyson, N. J. (2008) Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 713–724.
- Van Leene, J.–Boruc, J.–De Jaeger, G.–Russinova, E.–De Veylder, L. (2011) A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends Plant Sci* 16: 141–150.
- Vandepoele, K.–Raes, J.–De Veylder, L.–Rouzé, P.–Rombauts, S.–Inzé, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 14(4): 903–916.
- Vandepoele, K.–Vlieghe, K.–Florquin, K.–Hennig, L.–Beemster, G. T.–Gruissem, W.–Van de Peer, Y.–Inze, D.–De Veylder, L. (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol* 139: 316–328.
- De Veylder, L.–Beeckman, T.–Beemster, G. T.–de Almeida Engler, J.–Ormenese, S.–Maes, S.–Naudts, M.–Van Der Schueren, E.–Jacqumard, A.–Engler, G.–Inzé, D. (2002) Control

- of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO J* 21: 1360–1368.
- de Jager, S. M.–Scofield, S.–Huntley, R. P.–Robinson, A. S.–den Boer, B. G.–Murray, J. A. (2009) Dissecting regulatory pathways of G1/S control in Arabidopsis: common and distinct targets of CYCD3;1, E2Fa and E2FC. *Plant Mol Biol* 71: 345–365.
- De Veylder, L.–Beeckman, T.–Beemster, G. T.–Krols, L.–Terras, F.–Landrieu, I.–van der Schueren, E.–Maes, S.–Naudts, M.–Inzé, D. (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1653–1668.
- Vlieghe, K.–Boudolf, V.–Beemster, G. T.–Maes, S.–Magyar, Z.–Atanassova, A.–de Almeida Engler, J.–De Groot, R.–Inzé, D.–De Veylder, L. (2005) The DP-E2F-like gene DEL1 controls the endocycle in Arabidopsis thaliana. *Curr Biol* 15: 59–63.
- Weimer, K. A.–Nowack, M. K.–Bouyer, D.–Zhao, X. A.–Harashima, H.–Naseer, S.–De Winter, F.–Dissmeyer, N.–Geldner, N.–Schnittger, A. (2012) Retinoblastoma related1 regulates asymmetric cell divisions in Arabidopsis. *The Plant Cell* 24: 4083–4095.
- Wenzel, P. L.–Chong, J. L.–Saenz-Robles, M. T.–Ferre, A.–Hagan, J. P.–Gomez, Y. M.–Rajmohan, R.–Sharma, N.–Chen, H. Z.–Pipas, J. M.–Robinson, M. L.–Leone, G. (2011) Cell proliferation in the absence of E2F1–3. *Dev Biol* 351: 35–45.
- Wildwater, M.–Campilho, A.–Perez-Perez, J. M.–Heidstra, R.–Blilou, I.–Korthout, H.–Chatterjee, J.–Mariconti, L.–Gruissem, W.–Scheres, B. (2005) The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in Arabidopsis roots. *Cell* 123: 1337–1349.
- Wyrzykowska, J.–Schorderet, M.–Pien, S.–Gruissem, W.–Fleming, A. J. (2006) Induction of differentiation in the shoot apical meristem by transient overexpression of a retinoblastoma-related protein. *Plant Physiol* 141: 1338–1348.
- Zhu, W.–Giangrande, P. H.–Nevins, J. R. (2005) Temporal control of cell cycle gene expression mediated by E2F transcription factors. *Cell Cycle* 4: 633–636.

VI. A szárazság- és sótűrés szabályozása a virágos növényekben¹

SZABADOS LÁSZLÓ

Összefoglalás

Az utóbbi évtizedben a molekuláris és genomikai módszerek látványos fejlődésének köszönhetően sokat sikerült megtudni a növények szárazság- és sótűrésének szabályozásáról. Tudjuk, hogy az ilyen típusú abiotikus stresszre adott válaszokat sok gén és egy komplex jelátviteli rendszer szabályozza, amely különböző molekuláris szenzorokat, jelátvitelben résztvevő fehérje kinázokat, foszfatázokat, transzkripciót szabályozó faktorokat foglal magában. A rendelkezésünkre álló információ ellenére még nem sikerült teljesen megismerni a jelátviteli mechanizmusok közötti kapcsolatokat. Jelenleg a legtöbb információ az *Arabidopsisthaliana* modellnövényen áll rendelkezésünkre, de a stressztűrés kutatásában egyre nagyobb szerepet kapnak a szárazságtűrő, xerofita, illetve a sótűrő, halofita fajok is. A stressztűrő és -érzékeny fajok molekuláris és genomszintű összehasonlítása az alkalmazkodóképesség szabályozásának jobb megértéséhez vezethet. Mivel a szárazság és a szikes talajok elterjedése előreláthatóan fokozódik az elkövetkező évtizedben, a természetett növények ellenálló képességének javítása továbbra is kiemelt fontosságú marad a növénynemesítők számára. A korszerű nemesítési, agro-biotechnológiai módszerek alkalmazásához viszont elengedhetetlen a tolerancia szabályozásának molekuláris szintű ismerete.

Summary

Developments in molecular and genomic methods in the last decade significantly improved our understanding in the regulation of plant responses to environmental constraints such as drought and soil salinity. Tolerance to such stresses is controlled by many genes, regulating a multicomponent signal transduction system composed of interacting pathways, which includes molecular sensors, signaling protein kinases and phosphatases and a vast array of transcription factors, each controlling the expression of numerous genes. Despite these efforts, numerous aspects of stress responses are not yet known. Although most of the relevant information on stress responses have been generated on the model plant *Arabidopsis thaliana*, more and more data are published on other plants, including crops and extremophyle plants such as xerophytes and halophytes with high drought and salt tolerance, respectively. Comparison of extremophyle species and their non-tolerant relatives on a genomic scale can lead to breakthrough in understanding genetic and molecular bases of stress tolerance. As water scarcity and soil salinity is predicted to extend during the next decade, improvement of salt and drought tolerance of leading crops remains a principal concern for breeders. Use of modern breeding technologies will however require knowledge on the regulation of stress responses on molecular scale.

¹ Ez a munka az Országos Kutatási Alap (K-81765) és az IPA Cross-border Cooperation Program (HUSRB/1002/214/036) támogatásával jött létre.

Bevezetés

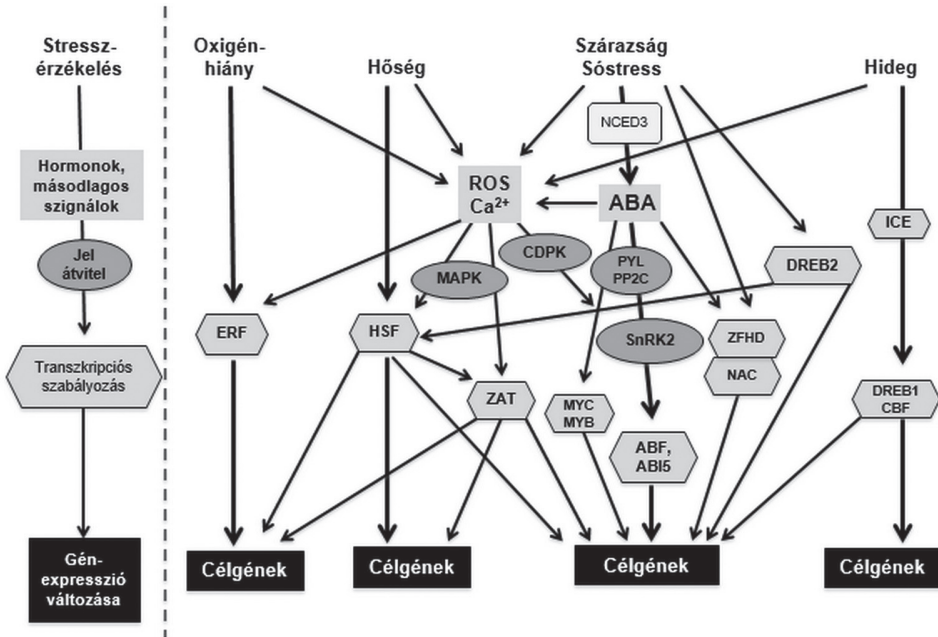
A fizikai környezet alapvetően meghatározza a növények növekedését, elterjedését. Minden növényfaj valamilyen szinten alkalmazkodott egy bizonyos környezetnek, ami lehetővé teszi, hogy növekedjen, szaporodjon. Vannak olyan környezeti feltételek, amelyek a növények nagy részének már nem megfelelőek, ugyanakkor bizonyos növényfajok meg tudnak élni a mások számára extrém körülmények között. A víz az egyik legfontosabb környezeti tényező, amely a növények elterjedését meghatározza. Vízhány olyan élőhelyeken lép fel, ahol kevés a csapadék, vagy a talaj magas sótartalma korlátozza a vízfelvételt. A víz hiánya ozmotikus stresszhez vezet, és ez a növények növekedését, életképességét alapvetően befolyásolja. A szárazságtűrő vagy xerofita növények képesek az aszályos időszakokat átvészelni, extrém esetekben minimális vízellátottságú, sivatagos körülmények között is megélni. A sótűrő vagy halofita növények olyan szikes környezetben is megélnék, ahol a talaj sótartalma túl magas a megfelelő szintű alkalmazkodóképességgel nem rendelkező, glikofita növények számára.

Az extrém környezetnek való alkalmazkodás szabályozása egy izgalmas, mindmáig hiányosan ismert tudományterület, amely az utóbbi években a növénybiológiai kutatások egyik legfontosabb területévé vált. A helyhez kötött növényeknek az alkalmazkodás jelenti az egyetlen túlélési lehetőséget, a homeosztázis fenntartásának érdekében a fejlődési, élettani és molekuláris folyamatok állandó kiigazítására, módosítására van szükség. A környezetnek való alkalmazkodás kulcsa egy flexibilis, többkomponensű szabályozási rendszer, amely magában foglalja a külső hatások érzékelését, a jelek továbbítását, módosítását, a génexpressziós változások koordinálását, az enzimatis aktivitások, a sejtek, szövetek közötti transzport vagy metabolikus folyamatok megfelelő kiigazítását. A száraz vagy szikes környezetnek való alkalmazkodás képességét számos gén szabályozza, ezek a gének többnyire kismértékben, de nem egyformán befolyásolják a stressztűrést. A szabályozó funkcióval rendelkező gének, mint például a szenzorfehérjék, protein kinázok vagy transzkripciós faktorok számos más gén működését ellenőrzik, ezért ezek befolyása nagyobb a szárazság- vagy sótűrés képességére, mint a más védekezési folyamatokban részt vevő gének hatása. Ezért a stresszválasz szabályozásában részt vevő gének működésének, kölcsönhatásainak megismerése a só- és szárazságtűrés megértésének egyik legfontosabb, legizgalmasabb feladata.

Az ozmotikus stressz érzékelése

A különböző stresszhatások érzékelése a környezettel történő kölcsönhatás első lépése. A szenzorok által generált jelek továbbítását, feldolgozását, a megfelelő molekuláris és élettani válaszok létrehozását egy komplex szabályozási rendszer ellenőrzi, amit az 1. ábra mutat be vázlatosan.

A magas sókoncentráció vagy a vízhány hasonló ozmotikus stresszt okoz. A szárazság során fellépő ozmotikus nyomás változását *Arabidopsis*-ban elsősorban az ATHK1



1. ábra. A stressztűrést szabályozó legfontosabb jelátviteli útvonalak. A környezeti hatások több, egymással párhuzamos, illetve egymással kölcsönható jelátviteli utat aktiválnak, amelyek meghatározott géncsoport expresszióját szabályozzák. Az ábra bal oldalán a jelátvitel vázlatos sémája látható. A jobb oldal a fontosabb ismert jelátviteli utakat és a közöttük lévő kapcsolatrendszerét mutatja be vázlatosan. A hormonok körül az abszizinsav (ABA) által szabályozott jelátviteli út központi szerepet tölt be a szárazság- és sóstressz által indukált gének aktiválásában. Legfontosabb az ABF transzkripciós faktorok által ellenőrzött jelátvitel, de fontos szerepe van a MYC/MYB, illetve az ZFHD/NAC faktoroknak is. A stresszjelek közvetítését ABA-tól független szabályozási utak is befolyásolják a HSF, ZAT, NAC, DREB1 és DREB2 transzkripciós faktorokon keresztül. A reaktív oxigénfajták (ROS) minden környezeti stressz során keletkeznek, és ZAT, HSF, ERF típusú transzkripciós faktorokon keresztül szabályozzák a célgének működését.

(forrás: Chinnusamy et al. 2004; Nakashima et al. 2009; Pucciariello et al. 2012)

hisztidin kináz érzékeli (Urao et al. 1999). A hisztidin kinázok közé tartozó ATHK1 ozmoszenzor hasonlít az élesztő SLN1 szenzorhoz, ami a HOG1 (high-osmolarity glycerol response 1) MAP kináz jelátviteli rendszeren keresztül az ozmoprotektív glicerol bioszintézisét indukálja (Posas et al. 1996). Az ATHK1 a mag érése során kialakuló dehidratáció szabályozásában is részt vesz, vagyis fejlődésbiológiai szerepe is van (Wohlbach et al. 2008). Alternatív ozmoszenzorként működik az *Arabidopsis* CRE1 (cytokinin response 1) hisztidin kináz, amely a SLN1-hez hasonlóan szintén az ozmotikus stressz érzékelésében vesz részt (Reiser et al. 2003). Mikrochip transzkript analízis bizonyította, hogy az ATHK1 számos stresszindukált gén, köztük több transzkripciós faktor (pl. ABF2, DREB2A, ANAC) expresszióját szabályozza. Az ATHK1 által

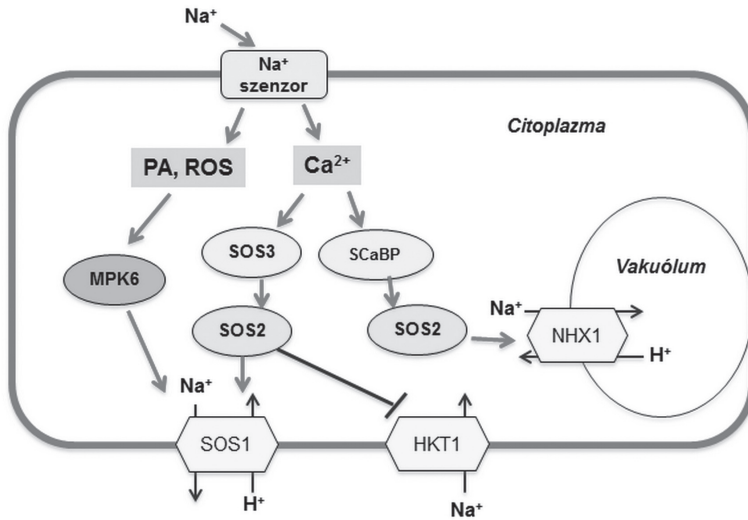
szabályozott gének között egyaránt található ABA-függő és -független indukciót mutató faktorok, vagyis ez a szenzor mindkét jelátviteli utat ellenőrzi (Tran et al. 2007). Az *athk1* mutáns érzékenyebb a szárazságra, ozmotikus és sóstresszre, ami arra utal, hogy a gén fontos szerepet tölt be az ellenálló képesség kialakításában (Tran et al. 2007). Újabb eredmények viszont arra utalnak, hogy az ATHK1 nem az egyedüli ozmoszenzor, mivel a mutánsban a prolin- és ABA-szintek nem változtak, és a bioszintézist szabályozó *P5CS1*, illetve *NCED3* gének expressziója sem csökkent számottevően (Kumar et al. 2012). Az ATHK1 hisztidin kinázhoz hasonló fehérjék más növényfajokban is megtalálhatók. A rizs OsHK3b és az ATHK1 nagyfokú hasonlóságot mutat, mindkettő speciális foszfortranszfer fehérjével kölcsönhatásban kapcsolódik a jelátviteli rendszerhez (Kushwaha et al. 2013).

A sóstressz érzékelése egyelőre nem ismert, nátriumszenzort eddig nem sikerült azonosítani. A Salt Overly Sensitive 1 (SOS1) Na^+/H^+ antiporter bizonyos tulajdonságai (hosszú citoplazmába nyúló doménje) arra utalnak, hogy ez a fehérje Na-szenzorként is működhet (Zhu 2003). A SOS1 szenzor funkcióját azonban mind ez ideig nem tudták egyértelműen bizonyítani.

A SOS szabályozási rendszer

A sóérzékenység szempontjából az egyik legfontosabb szabályozási mechanizmus a sejtre káros ionok, elsősorban a Na és Cl felvételét, sejten belüli koncentrációját ellenőrzi. Az ion-homeosztázist elsősorban a kation/ H^+ antiporter aktivitást mutató transzporterek biztosítják, amelyek a citoplazma és az extracelluláris tér, valamint a különböző organellumok közötti ionegyensúly fenntartásáért is felelősek. A HKT típusú membrán transzportereken keresztül jut be a Na^+ ion a citoplazmába, míg a SOS1, illetve az NHX1 típusú Na^+/H^+ antiporter a Na^+ ionok eltávolításáért vagy vakuólumba zárásáért felelősek (Munns és Tester 2008).

Az *Arabidopsis* modellnövényben sóérzékeny mutánsok (*sos*) segítségével sikerült a Na^+ homeosztázis szabályozásának legfontosabb szereplőit azonosítani. A sejtmembránhoz kapcsolódó SOS1 Na^+/H^+ antiporter fehérje funkciója elsősorban a káros Na^+ ionok növényi sejtekből történő eltávolítása, illetve szövetek közötti transzportja (Shi et al. 2000; Shi et al. 2002). A SOS1 antiporter aktiválásáért a SnRK3 kinázcsoportba tartozó SOS2 kináz felelős, amely kölcsönhatásban áll a SOS1 fehérjével és foszforilálja azt (Gong et al. 2002). A SOS2 kináz aktivitásához ugyanakkor elengedhetetlen a SOS3 kalciumkötő fehérjével való kölcsönhatás, ami csak magas sókoncentráció jelenlétében jön létre (Halfter et al. 2000; Qiu et al. 2002). A SOS2 nem csak a SOS1 fehérjét foszforilálja, de szubsztrátjai közé tartoznak más, az ionháztartást befolyásoló transzporterek vagy más stresszfehérjék is. Ilyen például a CAX1 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ vakuólum antiporter, amely a kalciumionok koncentrációját szabályozza, és amelyet a SOS2 aktivál (Cheng et al. 2004). A sejten belül az organellumok és a citoplazma közötti nátriumtranszportot a NHX1 Na^+/H^+ antiporter fehérjék biztosítják (Bassil et al. 2012). A SOS2 kináz szabályozza a vakuoláris NHX1 antiportert is: míg a *sos2* mutánsban a



2. ábra. A növényi sejt Na⁺ koncentrációját szabályozó rendszer. A még ismeretlen Na⁺ szenzor aktiválásának eredményeként kalcium szabadul fel, ami Ca²⁺ kötő fehérjéken (SOS3, ScaBP) keresztül aktiválja a SOS2 kinázt. A SOS2 foszforilálja és aktiválja a transzmembrán SOS1 és NHX1 Na⁺/H⁺ antiportereket, amelyek eltávolítják a Na⁺ ionokat a citoplazmából, illetve gátolja a HKT1 csatorna működését. A SOS1 aktivitását alternatív szabályozó mechanizmusok is befolyásolják, mint például a foszfatidinsav (PA) és a MAP kináz által közvetített foszforiláció (forrás: Zhu 2003; Ji et al. 2013)

NHX1-aktivitás alacsony, a SOS2-túltermelés megemeli a NHX1 aktivitását (Qiu et al. 2004). A SOS1 aktivitását ezenkívül a MPK6 MAP kináz is szabályozza. A sóstressz megemeli a foszfolipáz D (PLD) aktivitását, ami a foszfatidin sav (PA) felhalmozódásához vezet. A magas PA-szint indukálja a MPK6 kinázt, ami foszforilálja és ez által aktiválja a SOS1 transzportert is (Yu et al. 2010). A SOS szabályozási rendszert a 2. ábra mutatja be vázlatosan (Zhu 2003; Ji et al. 2013).

Míg a *sos* mutánsok fokozottan érzékenyek a sókezelésre, a SOS1-et vagy a SOS3-at túltermelő transzgenikus *Arabidopsis*sra a megemelkedett sótolerancia a jellemző (Shi et al. 2003; Yang et al. 2009). A Na ionok a HKT1 magas affinitású K⁺ transzporterén keresztül jutnak be a sejtekbe (Rus et al. 2001). *Arabidopsis*ban az *athkt1* mutáció el-lensúlyozza a *sos* mutánsok sóérzékenységét, míg az ATHKT1 túltermelése fokozott sóérzékenységgel jár (Rus et al. 2004).

Újabb közlemények bizonyítják, hogy a transzporterek természetes variabilitása felhasználható a nemesítési programokban. Fajok közötti keresztezéssel sikerült a durumbúzából származó *Nax1* és *Nax2* nevű HKT1 géneket átvinni a kenyérbúzába. A *Nax* géneket hordozó hibrid búza sófelvétele ezáltal 60%-kal csökkent az eredeti vonalhoz képest, ami jelentősen javította a sótoleranciát (James et al. 2011). Az iontranszporterek tehát fontos szerepet játszanak a sótolerancia meghatározásában, segítségükkel a haszonnövények ellenálló képessége is javítható.

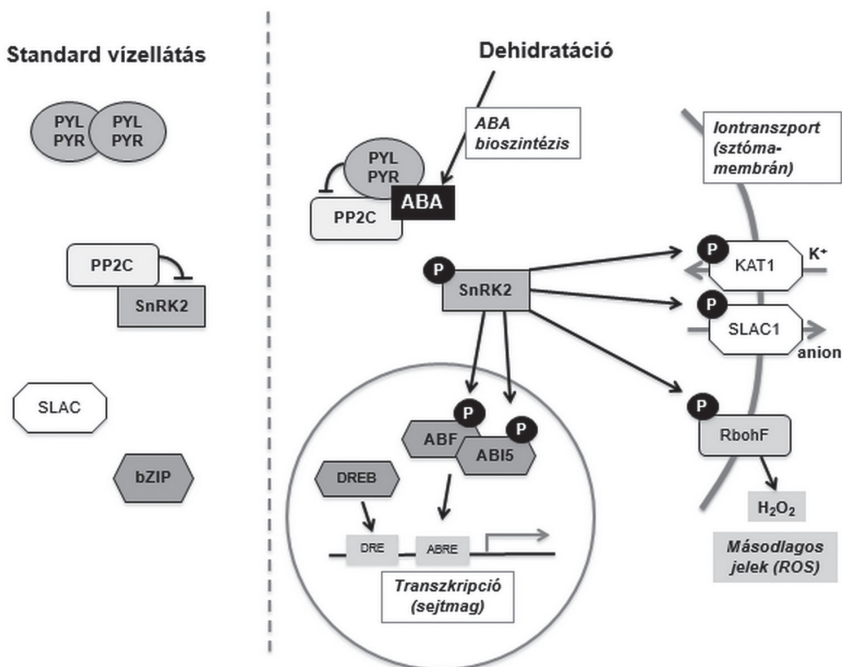
A reaktív oxigén fajták (ROS) szabályozó szerepe

A reaktív oxigén fajták (ROS) különböző környezeti stresszhatások során szabadulnak fel a kloroplasztokban, mitokondriumokban vagy peroxiszómákban. A leggyakoribb ROS a szuperoxid, hidrogén-peroxid, hidroxil gyökök vagy szinglet oxigén, amelyek agresszív oxidációs reakciók révén károsítják a sejt szerkezetét, a membránokat, fehérjéket, nukleinsavakat. A stresszhatások alatt az oxidatív károsodás elleni védekezés létfontosságú a növények számára. Antioxidánsok, mint például az aszkorbinsav és glutation, valamint detoxifikáló enzimek, mint a szuperoxid-dizmutáz, aszkorbát-peroxidáz vagy kataláz képesek a különböző reaktív oxigének semlegesítésére (Apel és Hirt 2004). Újabb eredmények szerint a klasszikus antioxidáns rendszerek mellett az ozmoprotektánsként ismert prolin vagy glicin betain felhalmozódása is hozzájárul a ROS káros hatásainak mérsékléséhez (Hoque et al. 2008; Islam et al. 2009). A sóstressznek kitett prolinhiányos *Arabidopsis p5cs1* mutánsokban magasabb hidrogén-peroxid-felhalmozódást és súlyosabb lipidperoxidációt figyeltek meg (Székely et al. 2008), míg prolin-kezelés vagy -túltermelés képes a szabad gyökök felhalmozódását csökkenteni, ezáltal az oxidatív károsodást mérsékelni (Hong et al. 2000; Wang et al. 2009).

A ROS közül a hidrogén-peroxid szignálmolekulaként is funkcionál, fontos szerepe van a különböző életfolyamatok szabályozásában, elsősorban a biotikus és abiotikus stresszhatások elleni védekezés koordinálásában (Foyer és Noctor 2005; Miller et al. 2010; Suzuki et al. 2012). A peroxid jelek továbbításának mechanizmusa még nem teljesen ismert. A ROS jelátviteli mechanizmus egyik ismert eleme a MAP kináz kaszkád, amit többféle környezeti hatás képes aktiválni. Egy minimális MAPK rendszer három kinázból áll, amelyek specifikusan egymást foszforilálják, és ezáltal aktiválják: MAP3K, MAP2K és a szerin-treonin kinázhoz tartozó MAPK. A növényekben minden kinázcsoportot számos gén kódol, ami egy komplex jelátviteli rendszert hoz létre (Colcombet és Hirt 2008; Doczi et al. 2012). *Arabidopsis*-ban a MPK3, MPK4 és MPK6 kinázokról ismert, hogy részt vesznek a ROS által közvetített stresszjelátvitelben (Colcombet és Hirt 2008). A peroxid jelekre érzékeny MPK3 és MPK6 kinázokat a MKK4 és MKK5 kinázok (MAP2K) foszforilálják, amelyek patogénekre, nehézfém, ozmotikus és sóstresszhatásokra, valamint ABA jelekre reagálnak (Droillard et al. 2002; Teige et al. 2004; Liu et al. 2010). A MKK1 és MKK2 (MAP2K) által foszforilált MPK4 kináz a hideg-, só- és ozmotikus hatásokra reagál, illetve az ilyen stresszel szembeni ellenálló képességet szabályozza (Teige et al. 2004; Pitzschke et al. 2009). A MAP kinázok többféle fehérjét foszforilálnak, köztük transzkripciós faktorokat, amelyek számos célgén expresszióját szabályozzák. A MAPK rendszer eddig megismert célpontjai közé tartoznak egyes WRKY, ERF, HSE, ZAT típusú transzkripciós faktorok. A hősokk faktorok közül az *Arabidopsis* HSFA2 és HSFA4 faktorról bizonyították, hogy a MPK6, illetve MPK3 MAP kinázok foszforilálják őket, ezáltal a MAP kináz rendszer célpontjai lehetnek (Evrard et al. 2013; Pérez-Salamó et al. 2014). Mindkét faktor többféle stressz elleni tolerancia szabályozásában vesz részt.

Az abszcizinsav (ABA) által ellenőrzött jelátvitel

A növényekben több hormon is részt vesz a káros környezeti hatások elleni védekezés koordinálásában. A szárazság- és sötétítés szempontjából a legfontosabb az abszcizinsav (ABA), amely elengedhetetlen komponense az ozmotikus stressz által kiváltott jelátviteli rendszereknek. ABA indukálja a sztómazáródást, a stressz során megfigyelhető génexpressziós változások nagy részét, de fontos szerepe van több, a dehidratációval kapcsolatos fejlődési folyamat szabályozásában is. ABA szabályozza az embriófejlődés késői fázisait, a mag érését, a csírázást, de befolyásolja a virágzást, gyökérfejlődést is (Finkelstein 2013). Az ABA-koncentrációt (ami néhány ng lehet egy g szövetben) a bioszintézis és degradáció közötti arány határozza meg, de befolyásolja a transzport, illetve a glükozid konjugációval történő inaktiváció is. Az ABA bioszintézis a karotin metabolizmus egy speciális ága, amit ABA-hiányos mutánsok (*aba*) segítségével derítették fel az *Arabidopsis* modellnövényben. A bioszintézis első lépései a kloroplasztban, utána a citoplazmában történnek. Az ABA bioszintézis szabályozó, meghatározó lépése a xanthoxin előállításáért felelős 9-cis-epoxikarotenoid



3. ábra. Az abszcizinsav (ABA) jelátvitel legfontosabb elemei. Megfelelő vízellátás esetén ABA hiányában a PP2C foszfatáz megkötí és ezáltal gátolja a SnRK2 kinázok működését. A PYL/PYR receptor fehérjék az ABA segítségével megkötik a PP2C foszfatázt, ezáltal a felszabaduló SnRK2 kinázok foszforilálni tudják az ABF transzkripciós faktorokat, illetve a sztómák specifikus iontranszportereit. A foszforilált ABF típusú transzkripciós faktorok az ABRE promóter elemekhez kapcsolódva indukálják a célgének transzkripcióját (forrás: Hubbard et al. 2010; Finkelstein 2013)

dioxigenáz enzim, amit *Arabidopsis*-ban a só és szárazság által indukált *NCED3* gén kódol (Luchi et al. 2001). Az *NCED3* gén transzkripcióját egy R2R3 típusú MYB transzkripciófaktor, a HOS10 szabályozza. Az ozmotikus stressznek kitett növényekben a HOS10 elengedhetetlen az *NCED3* gén indukciójához és az ABA szintézis beindításához (Zhu et al. 2005). A hormonszintet az ABA-lebontás is befolyásolja, amiért elsősorban speciális P450 típusú monooxigenázok (CYP707A1, CYP707A2, CYP707A3) felelősek (Okamoto et al. 2006). A dehidratáció során felhalmozódó ABA hatása koncentrációfüggő, ami eltérő lehet a különböző sejtípusokban. Az ABA-érzékenység szintje fontos só- és szárazságtűrés szempontjából: az ABA-ra érzékenyebb növények, vonalak általában ellenállóbbak az ilyen típusú stresszhatásokra.

Az ABA-érzékelés és -jelátvitel számos eleme ismert, ennek ellenére akadnak felderítetlen részei az ABA-szabályozásnak. A legismertebb és az ozmotikusstressz-tolerancia szempontjából legfontosabb jelátviteli utat a 3. ábra mutatja. Megfelelő vízellátottság esetén a PP2C típusú fehérje foszfatázok (pl. ABI1, ABI2) fizikailag megkötik, defoszforilálják, és ezáltal inaktíválják a SnRK2 kinázcsoportba tartozó fehérje kinázokat, amelyek az ABA-jelátvitel legfontosabb pozitív szabályozó elemei. Ozmotikus stressz esetén a felhalmozódó abszcizinsav kapcsolódik a PYL/PYR receptorfehérjéhez, ami leköti a PP2C foszfatázt. A receptor-ABA-PP2C komplexben a foszfatáz aktivitása minimálisra csökken, és felszabadul a SnRK2 kináz, amely ezután képes a szubsztrát fehérjéket foszforilálni és aktiválni (Melcher et al. 2009; Santiago et al. 2009). A legfontosabb SnRK2 szubsztrátok az ABA-jelátvitelben szerepet játszó transzkripciófaktorok, egyes ioncsatornák, illetve peroxidot előállító membránfehérjék. Az aktivált SnRK2 kinázok a sztóma membránban lévő SLAC1 anion- és KAT1 kationcsatornákat is foszforilálják. Az OST1 kináz (SnRK2.6), illetve egy kalciumfüggő protein kináz (CDPK) által foszforilált SLAC1 ioncsatorna anionkiáramlást (klorid, nitrát), majd közvetve káliumion- és vízvesztést eredményez, ami a sztómák záródásához vezet. A PP2C foszfatázok a SLAC1 defoszforilációjával gátolják az ioncsatorna működését, és a sztómányílást segítik (Brandt et al. 2012). A KAT1 ioncsatorna foszforilációja gátolja a káliumionok transzportját, ami a sztómák zárásához szükséges (Sato et al. 2009). Az ABA által indukált sztómazáródást a másodlagos jelátvitelt biztosító hidrogén-peroxid is befolyásolja. A plazmamembránban lokalizált RbohF típusú NADPH oxidázt szintén a SnRK2 csoportba tartozó OST1 kináz foszforilálja, ezáltal aktiválja, ami H₂O₂-felszabadulással jár (Sirichandra et al. 2009). A képződő peroxid további jelátviteli reakciót indít be, ami sztómazáródáshoz vezet, illetve specifikus génextpressziós változásokkal jár (3. ábra).

A stressztől függő transzkripciószabályozás

A szárazság vagy a sóstressz során több ezer gén transzkripciószabályozása változik meg. A modern transzkript analitikai módszerek (DNS-chip, RNS-szekvenálás, RNA-seq) lehetővé tették az egész genomra kiterjedő szárazságra vagy sóstresszre jellemző transzkript profilok azonosítását, jellemzését. A hideg, az ozmotikus vagy sóstressz

az *Arabidopsis* gének közel 30%-át aktiválja vagy represszálja. A génexpressziós változások nagy része specifikus az adott kezelésre, kisebb részüknél átfedéseket lehet találni az egyes kezelések között (Kreps et al. 2002; Kilian et al. 2007). *Arabidopsis*-ban közel 2000 szárazságra indukálódó gént sikerült azonosítani, amelyek közel 2/3-át ABA-kezelés is aktiválta (Huang et al. 2008). A genom szintű transzkript adatok fontosak a hasonló vagy eltérő módon szabályozott gének csoportosításához, az egyes szabályozási utak feltárásához. Az interneten elérhető transzkript adatbázisok és szofisztikált bioinformatikai eszközök lehetővé teszik a szabályozási, jelátviteli utak további genom szintű jellemzését (Zimmermann et al. 2005).

A génexpressziót elsősorban a transzkripció faktorok (TF) szabályozzák, amelyek a célgének promóterének meghatározott szabályozó elemeit ismerik fel, és így segítik elő a transzkripció beindítását. Egy-egy TF több száz gén expresszióját is szabályozhatja (regulon). A különböző környezeti hatások meghatározott géncsoportok expresszióját aktiválják specifikus transzkripció faktorokon keresztül (1. ábra). A legtöbb szárazság- és sóstressz által indukált gént az ABA is aktiválja. Az ABA által indukált gének promóter régiójában megtalálható a G-box csoportba tartozó ABRE (ABA Responsive Element, PyACGTGG/TC) szabályozó motívum, amelyeket bázikus leucin zipper (bZIP) csoportba tartozó transzkripció faktorok (AREB vagy ABF) ismernek fel (Iwasaki et al. 1995; Choi et al. 2000; Fujita et al. 2005). Az AREB/ABF transzkripció faktorok az ABA-jelátvitelben központi szerepet játszó SnRK2 kinázok szubsztrátjai. Foszforilációjuk elengedhetetlen az ABA indukált gének promóterében lévő ABRE szekvencia motívumhoz való kapcsolódáshoz és a célgének transzkripciójának beindításához (3. ábra). A magas szintű génexpresszió biztosításához több ABRE elem vagy az ABRE és DRE (Dehydration-responsive Element) elemek együttes jelenléte szükséges (Narusaka et al. 2003). Az ABA által szabályozott bZIP faktorok közé tartozik az ABI5 transzkripció faktor, amely számos késői embriogenezis során indukált (LEA) gén aktivációjáért felel, de közvetlenül gátolja a csírázást, és befolyásolja a virágzást is (Finkelstein és Lynch 2000; Piskurewicz et al. 2008; Wang et al. 2013). Az ABF2, ABF3 és ABF4 transzkripció faktorok a dehidratáció és magas sókoncentráció jelenlétében aktiválódnak, és elsősorban a vegetatív szövetekben indukálják az ABA-tól függő gének transzkripcióját. Az ABF2 konstitutív formájának túltermelése ABA hiperszenzitivitással járt, és javítja a szárazságtűrést, míg az *abf2* mutánsok érzékenyebbek a vízvesztésre (Fujita et al. 2005).

Számos ABA által indukált gén promóterében hiányoznak a jellegzetes ABRE elemek. Ilyen például az *Arabidopsis* RD22 és az ADH1 génje, amelyeket MYC2 és MYB2 transzkripció faktorok aktiválnak. Az RD22 gén promóterében azonosították az ABA indukált MYC2, illetve MYB2 transzkripció faktor kötő helyeket, amelyek szükségesek a gén indukációjához (Abe et al. 1997). A MYB2 és MYC2 transzkripció faktorok az RD22-n kívül több más ABA által indukált gén transzkripcióját is szabályozzák, de szerepük van más jelátviteli folyamatok, mint például a jázmonsav-szabályozás koordinálásában is (Abe et al. 2003). Több stressz által indukált gén aktivitását a NAC domént tartalmazó transzkripció faktorok szabályozzák. A dehidratációra gyorsan aktiválódó *Arabidopsis* ERD (Early Response to Dehydration) gén transzkripcióját a NAC

csoportba tartozó ANAC19, ANAC55 és ANAC72 transzkripciós faktorok, valamint a ZFHD (Zinc-finger homeodomain) faktor együttesen szabályozzák.

Az ozmotikus stresszválaszt az ABA hormontól független szabályozási rendszerek is ellenőrzik. Az ilyen jelátvitelt közvetítő legfontosabb transzkripciós faktor család az Apetala2 (AP2/ERF) DNS-kötő domént tartalmazó DREB1/CBF, illetve a DREB2 típusú fehérjék, amelyek DRE (Dehydration-Responsive Element) vagy CRT (C-repeat) cisz szabályozó elemekhez kapcsolódnak. A DRE elemet (A/GCCGAC) számos szárazság, só és hideg által indukált gén promóterében azonosították (Yamaguchi-Shinozaki és Shinozaki 1994). A DRE/CRT szabályozó elemeket felismerő transzkripciós faktorok az ABA hormontól függetlenül aktiválják a célgéneket. A DREB1/CBF csoportba tartozó transzkripciós faktorok elsősorban a hideg indukciót közvetítik, míg a DREB2 típusú faktorok a szárazság- és sóstressz által kiváltott génaktivációt szabályozzák (Liu et al. 1998). A DREB2A-CA gén konstitutív túltermelése jelentősen megemelte a transzgenikus növények szárazságtűrését, de apró, abnormalis fenotípushoz is vezetett (Sakuma et al. 2006). A gén túltermelése nemcsak só és szárazság indukált gének expresszióját emelte meg, de több hősokk gént, köztük a HSFA3 hősokk faktort is aktivált (Sakuma et al. 2006; Yoshida et al. 2008). Számos ABA indukált gén, mint például az RD29A promóterében DRE/CRT elemet is azonosítottak, ami az adott gének kombinált, ABA-függő és -független aktivációjával jár (Narusaka et al. 2003). Ezek az eredmények mutatják, hogy az egyes jelátviteli utak között számottevő kölcsönhatás létezik.

A szárazság-, illetve a sóstressznek kitett növényekben felszabaduló hidrogén-peroxid számos gén transzkripcióját változtatja meg, köztük több WRKY, HSF és ZAT típusú transzkripciós faktor expresszióját indukálja (Davletova et al. 2005; Miller et al. 2010). Az *Arabidopsis* transzkripciós faktorok közül a ZAT12 központi szerepet játszik az oxidatív stressz során indukált gének transzkripciós szabályozásában. Például a ZAT12 aktiválja a ROS detoxifikációban fontos aszkorbát-peroxidázt kódoló APX1 gént is (Davletova et al. 2005). A hősokk faktor (HSF) gének közül többnek az expressziója nem csak magas hőmérséklet esetén, hanem más káros hatásoknak, köztük oxidatív stressznek kitett növényekben is aktiválódik (Miller et al. 2010; Pucciariello et al. 2012; Pérez-Salamó et al. 2014). A hősokk faktorok nemcsak mint transzkripciós aktivátorok, de mint lehetséges peroxid szenzorok is fontos szerepet töltenek be a ROS jelátvitelben. A hősokk faktorok homo- vagy heterotrimer formában aktívak, trimerizáció után képesek a célgének promóterében található hősokk elemeket (HSE) felismerni. A hidrogén-peroxid a HSF cisztein oldalláncok oxidálásával stabilizálni tudja a HSF aktív, trimer formáját, ezáltal hozzájárul a célgének transzkripciójának indukciójához (Miller és Mittler 2006; Volkov et al. 2006; Kotak et al. 2007; Pérez-Salamó et al. 2014). A HSF trimerek kialakulása így érzékenyen követi a peroxidkoncentráció változásait, ami a célgének ROS-függő aktivációját is befolyásolja. A hősokk fehérjéket kódoló HSP gének mellett a hősokk faktorok ellenőrzik számos stressz fehérjét, illetve detoxifikáló enzimet kódoló gén aktiválását is (Scharf et al. 2012). A peroxid jelek érzékelésén keresztül a hősokk faktorok fontos szerepet játszanak egy általános, többféle környezeti hatásra reagáló stresszválasz szabályozásában. A HSFA4 hősokk

faktor túltermelése megemelte a transzgenikus *Arabidopsis* növények só és ozmotikus stresszel szembeni ellenálló képességét, ami arra utal, hogy ezek a faktorok többféle káros környezeti hatás kivédésében vesznek részt (4. ábra) (Pérez-Salamó et al. 2014). Független kutatások megerősítették, hogy a hősokk faktorok jó része nemcsak a termo toleranciát ellenőrzi, de szerepe van olyan káros hatások kivédésében, amit az anoxia, só, nehézfém, oxidatív vagy ozmotikus stressz okoz (Ogawa et al. 2007; Banti et al. 2010; Liu et al. 2011; Pucciariello et al. 2012; Bechtold et al. 2013). Az eddigi eredmények alapján elmondható, hogy a HSF rendszer alkalmas több, egyidejűleg fellépő káros hatással szembeni tolerancia javítására.

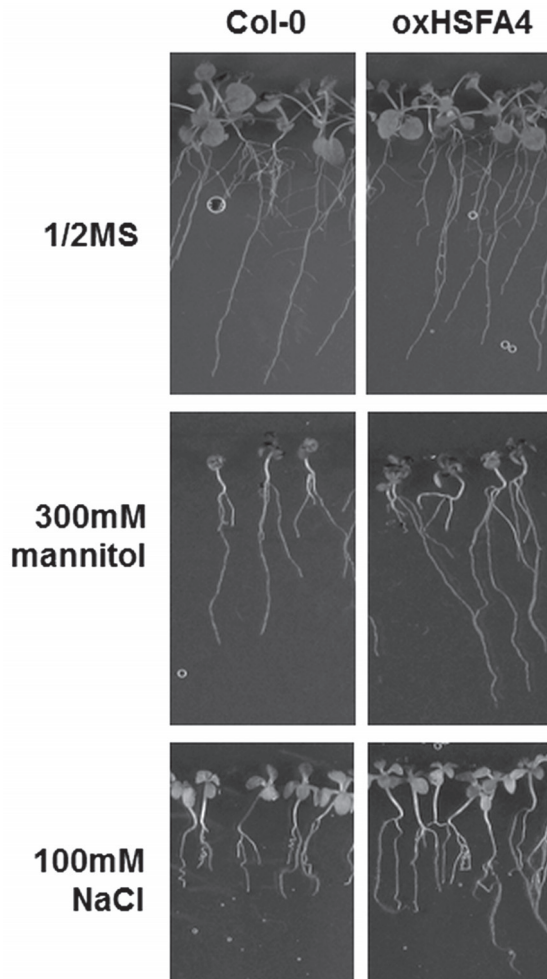
Eredményeink a stresszbiológiai kutatások területén

Az *Arabidopsis* modellnövényt alkalmazva csoportunk több területen végez stresszbiológiai kutatásokat. Genetikai módszerekkel több olyan szabályozó gént azonosítottunk, melyek a só- és szárazságtűrést, illetve az ABA által szabályozott jelátviteli folyamatokat befolyásolják (Papdi et al. 2009; Papdi et al. 2010). A kutatásainkhoz egy németországi kutatócsoporttal közreműködve (Koncz Csaba, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln) korábban kidogoztuk és hazai viszonyok között először alkalmaztuk a T-DNS inszerciós mutagenézis, illetve géncspadázás módszerét, ami lehetővé tette az inszerciós mutánsok izolálását (Szabados et al. 2002; Alvarado et al. 2004). A cDNS könyvtár transzfer segítségével egy új típusú genetikai rendszert dolgoztunk ki, amely indukált, domináns fenotípusú vonalak segítségével lehetővé tette a stresszválaszt befolyásoló gének izolálását (Papdi et al. 2008; Rigo et al. 2012).

A mutánszűrések eredményeként izoláltuk a *ppr40* mutánt, amely fokozott só- és ABA-érzékenységet mutatott. Ebben a mutánsban a T-DNS inszerció egy olyan, korábban ismeretlen mitokondriális fehérjét kódoló gént inaktivált, amely a mitokondriális elektrontranszport stabilitásához járul hozzá stresszkörülmények között (Zsigmond et al. 2008). A PPR40 fehérje az elektrontranszport lánc III. komplexéhez kapcsolódik, és szabályozza az aszkorbát-glutation ciklust (Zsigmond et al. 2011). Míg a funkcióvesztéses *ppr40* mutáns stresszérzékeny volt, a PPR40 fehérje túltermeltetésével sikerült a transzgenikus vonalak sótoleranciáját javítani (Zsigmond et al. 2012). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a mitokondrium funkciói fontosak a só és egyéb káros környezeti hatásokkal szembeni ellenálló képesség szempontjából. A mutánsok genetikai szűrése eredményeként sikerült a CRK5 gént inaktíváló mutánt izolálni, ami megváltozott gyökérfejlődést, geotropizmust mutatott. A CRK5 kináz jellemzése során bebizonyosodott, hogy a mutáns fenotípusát az auxintranszportot szabályozó PIN gének foszforilációjának változása okozta (Rigo et al. 2013). A gyökér fontos a szárazság- és sótűrés szempontjából, ezért az azt szabályozó CRK5 kináz jellemzése fontos információkkal szolgálhat az auxintranszport, a gyökérfejlődés és morfológia és a növények stresszérzékenységeinek összefüggéseiről.

A cDNS könyvtár szűrés eredményeként több szabályozó gént sikerült izolálni. A HSF4A hősokk faktor sejt kultúrákban vagy transzgenikus növényekben történő

túltermelése só-, nehézfém- és ozmotikusstressz-toleranciát eredményezett, bizonyítva, hogy ez a transzkripció faktor többféle stresszel szemben képes fokozni a növények ellenálló képességét (4. ábra; Pérez-Salamó et al. 2014). A HSF4A-túltermelő növények oxidatív károsodása kisebb, míg a funkcióvesztéses *hsfa4a* mutáns károsodása nagyobb mértékű volt, mint a vad típusú növényeké, bizonyítva, hogy a HSF4A faktor elsősorban az oxidatív stresszel szembeni védelem révén képes a növények ellenállóságát befolyásolni.



4. ábra. A HSF4A hőszokk transzkripció faktor túltermelése javítja az *Arabidopsis* só- és ozmotikus stresszel szembeni ellenálló képességét. A vad típusú (Col-0), illetve HSF4A-túltermelő (oxHSFA4) növények növekedése a standard táptalajon (1/2MS) hasonló. Magas ozmotikum (mannitol) vagy só (NaCl) gátolja mindkét vonal növekedését, de a HSF4-túltermelő növények növekedését kevésbé veti vissza, mint a vad típusú növényekét (Pérez-Salamó et al. 2014)

Az ozmotikus stressznek kitett növényekben az egyik jellemző metabolikus változás a prolinkoncentráció emelkedése. Korábbi kutatásaink során izoláltuk és jellemeztük a prolin-bioszintézist szabályozó, eltérő transzkripciók kontroll alatt lévő *P5CS1* és *P5CS2* géneket (Strizhov et al. 1997; Ábrahám et al. 2003). Inszerciós mutánsok felhasználásával bizonyítottuk, hogy a *P5CS1* gén kiütése meggátolja a só által indukált prolinfelhalmozódást, míg a *P5CS2* gén mutációja embrió letalitáshoz vezet. Eredményeink egyértelműen bizonyították, hogy a prolinfelhalmozódás fontos a sótolerancia szempontjából, stabilizálja a reaktív oxigéneket (ROS) semlegesítő glutation-aszkorbát ciklusban részt vevő enzimeket, és ezáltal csökkenti a stressznek kitett növények oxidatív károsodását (Székely et al. 2008). A prolin tehát egy több funkcióval rendelkező aminosav, amely elengedhetetlen a normális egyedfejlődéshez, de amelynek fontos szerepe van az oxidatív károsodás csökkentésében, a stressztűrés szabályozásában is (Lehmann et al. 2010; Szabados és Savoure 2010).

Felhasznált irodalom

- Abe, H.–Urao, T.–Ito, T.–Seki, M.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63–78.
- Abe, H.–Yamaguchi-Shinozaki, K.–Urao, T.–Iwasaki, T.–Hosokawa, D.–Shinozaki, K. (1997) Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859–1868.
- Ábrahám, E.–Rigo, G.–Székely, G.–Nagy, R.–Koncz, C.–Szabados, L. (2003) Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 51: 363–372.
- Alvarado, M. C.–Zsigmond, L. M.–Kovacs, I.–Cseplo, A.–Koncz, C.–Szabados, L. M. (2004) Gene trapping with firefly luciferase in Arabidopsis. Tagging of stress-responsive genes. *Plant Physiol* 134: 18–27.
- Apel, K.–Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373–399.
- Banti, V.–Mafessoni, F.–Loreti, E.–Alpi, A.–Perata, P. (2010) The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol* 152: 1471–1483.
- Bassil, E.–Coku, A.–Blumwald, E. (2012) Cellular ion homeostasis: emerging roles of intracellular NHX Na⁺/H⁺ antiporters in plant growth and development. *J Exp Bot* 63: 5727–5740.
- Bechtold, U.–Albihlal, W. S.–Lawson, T.–Fryer, M. J.–Sparrow, P. A.–Richard, F.–Persad, R.–Bowden, L.–Hickman, R.–Martin, C.–Beynon, J. L.–Buchanan-Wollaston, V.–Baker, N. R.–Morison, J. I.–Schoffl, F.–Ott, S.–Mullineaux, P. M. (2013) Arabidopsis HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection. *J Exp Bot* 64: 3467–3481.
- Brandt, B.–Brodsky, D. E.–Xue, S.–Negi, J.–Iba, K.–Kangasjarvi, J.–Ghassemian, M.–Stephan, A. B.–Hu, H.–Schroeder, J. I. (2012) Reconstitution of abscisic acid activation of SLAC1

- anion channel by CPK6 and OST1 kinases and branched ABI1 PP2C phosphatase action. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 10593–10598.
- Cheng, N. H.–Pittman, J. K.–Zhu, J. K.–Hirschi, K. D. (2004) The protein kinase SOS2 activates the Arabidopsis H(+)/Ca(2+) antiporter CAX1 to integrate calcium transport and salt tolerance. *J Biol Chem* 279: 2922–2926.
- Chinnusamy, V.–Schumaker, K.–Zhu, J. K. (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55: 225–236.
- Choi, H.–Hong, J.–Ha, J.–Kang, J.–Kim, S. Y. (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723–1730.
- Colcombet, J.–Hirt, H. (2008) Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413: 217–226.
- Davletova, S.–Rizhsky, L.–Liang, H.–Shengqiang, Z.–Oliver, D. J.–Coutu, J.–Shulaev, V.–Schlauch, K.–Mittler, R. (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 268–281.
- Davletova, S.–Schlauch, K.–Coutu, J.–Mittler, R. (2005) The zinc-finger protein Zat12 plays a central role in reactive oxygen and abiotic stress signaling in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 847–856.
- Doczi, R.–Okresz, L.–Romero, A. E.–Paccanaro, A.–Bogre, L. (2012) Exploring the evolutionary path of plant MAPK networks. *Trends Plant Sci* 17: 518–525.
- Dröillard, M.–Boudsocq, M.–Barbier-Brygoo, H.–Lauriere, C. (2002) Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in Arabidopsis thaliana cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Lett* 527: 43–50.
- Evrard, A.–Kumar, M.–Lecourieux, D.–Lucks, J.–von Koskull-Doring, P.–Hirt, H. (2013) Regulation of the heat stress response in Arabidopsis by MPK6-targeted phosphorylation of the heat stress factor HsfA2. *PeerJ* 1: e59.
- Finkelstein, R. (2013) Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book* 11: e0166.
- Finkelstein, R. R.–Lynch, T. J. (2000) The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599–609.
- Foyer, C. H.–Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875.
- Fujita, Y.–Fujita, M.–Satoh, R.–Maruyama, K.–Parvez, M. M.–Seki, M.–Hiratsu, K.–Ohme-Takagi, M.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005) AREB1 Is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 3470–3488.
- Gong, D.–Guo, Y.–Jagendorf, A. T.–Zhu, J. K. (2002) Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* 130: 256–264.
- Halfter, U.–Ishitani, M.–Zhu, J. K. (2000) The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 3735–3740.

- Hong, Z.–Lakkineni, K.–Zhang, Z.–Verma, D. P. (2000) Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol* 122: 1129–1136.
- Hoque, M. A.–Banu, M. N.–Nakamura, Y.–Shimoishi, Y.–Murata, Y. (2008) Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol* 165: 813–824.
- Huang, D.–Wu, W.–Abrams, S. R.–Cutler, A. J. (2008) The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J Exp Bot* 59: 2991–3007.
- Hubbard, K. E.–Nishimura, N.–Hitomi, K.–Getzoff, E. D.–Schroeder, J. I. (2010) Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev* 24: 1695–1708.
- Islam, M. M.–Hoque, M. A.–Okuma, E.–Banu, M. N.–Shimoishi, Y.–Nakamura, Y.–Murata, Y. (2009) Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J Plant Physiol* 166: 1587–1597.
- Iuchi, S.–Kobayashi, M.–Taji, T.–Naramoto, M.–Seki, M.–Kato, T.–Tabata, S.–Kakubari, Y.–Yamaguchi-Shinozaki, K.–Shinozaki, K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 27: 325–333.
- Iwasaki, T.–Yamaguchi-Shinozaki, K.–Shinozaki, K. (1995) Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet* 247: 391–398.
- James, R. A.–Blake, C.–Byrt, C. S.–Munns, R. (2011) Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J Exp Bot* 62: 2939–2947.
- Ji, H.–Pardo, J. M.–Batelli, G.–Van Oosten, M. J.–Bressan, R. A.–Li, X. (2013) The Salt Overly Sensitive (SOS) pathway: established and emerging roles. *Mol Plant* 6: 275–286.
- Kilian, J.–Whitehead, D.–Horak, J.–Wanke, D.–Weinl, S.–Batistic, O.–D'Angelo, C.–Bornberg-Bauer, E.–Kudla, J.–Harter, K. (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J* 50: 347–363.
- Kotak, S.–Larkindale, J.–Lee, U.–von Koskull-Doring, P.–Vierling, E.–Scharf, K. D. (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10: 310–316.
- Kreps, J. A.–Wu, Y.–Chang, H. S.–Zhu, T.–Wang, X.–Harper, J. F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* 130: 2129–2141.
- Kumar, M. N.–Jane, W. N.–Verslues, P. E. (2012) Role of the putative osmosensor *Arabidopsis* histidine kinase1 in dehydration avoidance and low-water-potential response. *Plant Physiol* 161: 942–953.
- Kushwaha, H. R.–Singla-Pareek, S. L.–Pareek, A. (2013) Putative osmosensor - OsHK3b - a histidine kinase protein from rice shows high structural conservation with its ortholog AtHK1 from *Arabidopsis*. *J Biomol Struct Dyn* 32: 1318–1332.

- Lehmann, S.–Funck, D.–Szabados, L.–Rentsch, D. (2010) Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39: 949–962.
- Liu, H. C.–Liao, H. T.–Charng, Y. Y. (2011) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* 34: 738–751.
- Liu, Q.–Kasuga, M.–Sakuma, Y.–Abe, H.–Miura, S.–Yamaguchi-Shinozaki, K.–Shinozaki, K. (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1391–1406.
- Liu, X. M.–Kim, K. E.–Kim, K. C.–Nguyen, X. C.–Han, H. J.–Jung, M. S.–Kim, H. S.–Kim, S. H.–Park, H. C.–Yun, D. J.–Chung, W. S. (2010) Cadmium activates Arabidopsis MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71: 614–618.
- Melcher, K.–Ng, L. M.–Zhou, X. E.–Soon, F. F.–Xu, Y.–Suino-Powell, K. M.–Park, S. Y.–Weiner, J. J.–Fujii, H.–Chinnusamy, V.–Kovach, A.–Li, J.–Wang, Y.–Peterson, F. C.–Jensen, D. R.–Yong, E. L.–Volkman, B. F.–Cutler, S. R.–Zhu, J. K.–Xu, H. E. (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* 462: 602–608.
- Miller, G.–Mittler, R. (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot* 98: 279–288.
- Miller, G.–Suzuki, N.–Ciftci-Yilmaz, S.–Mittler, R. (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33: 453–467.
- Munns, R.–Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59: 651–681.
- Nakashima, K.–Ito, Y.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiol* 149: 88–95.
- Narusaka, Y.–Nakashima, K.–Shinwari, Z. K.–Sakuma, Y.–Furihata, T.–Abe, H.–Narusaka, M.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* 34: 137–148.
- Ogawa, D.–Yamaguchi, K.–Nishiuchi, T. (2007) High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* 58: 3373–3383.
- Okamoto, M.–Kuwahara, A.–Seo, M.–Kushiro, T.–Asami, T.–Hirai, N.–Kamiya, Y.–Koshihara, T.–Nambara, E. (2006) CYP707A1 and CYP707A2, which encode abscisic acid 8'-hydroxylases, are indispensable for proper control of seed dormancy and germination in Arabidopsis. *Plant Physiol* 141: 97–107.
- Papdi, C.–Abraham, E.–Joseph, M. P.–Popescu, C.–Koncz, C.–Szabados, L. (2008) Functional identification of Arabidopsis stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol* 147: 528–542.
- Papdi, C.–Joseph, M. P.–Pérez-Salamó, I.–Szabados, L. (2009) Genetic technologies for the identification of Arabidopsis genes controlling environmental stress responses. *Funct Plant Biol* 36: 696–720.
- Papdi, C.–Leung, J.–Joseph, M. P.–Salamo, I. P.–Szabados, L. (2010) Genetic screens to identify plant stress genes. *Methods Mol Biol* 639: 121–139.

- Pérez-Salamó, I.–Papdi, C.–Rigó, G.–Zsigmond, L.–Vilela, B.–Lumbreras, V.–Nagy, I.–Horváth, B.–Domoki, M.–Darula, Z.–Medzihradzky, K.–Bögre, L.–Koncz, C.–Szabados, L. (2014) The Heat Shock Factor A4A Confers Salt Tolerance and Is Regulated by Oxidative Stress and the Mitogen-Activated Protein Kinases MPK3 and MPK6. *Plant Physiol* 165: 319–334.
- Piskurewicz, U.–Jikumaru, Y.–Kinoshita, N.–Nambara, E.–Kamiya, Y.–Lopez-Molina, L. (2008) The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits Arabidopsis seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell* 20: 2729–2745.
- Pitzschke, A.–Djamei, A.–Bitton, F.–Hirt, H. (2009) A major role of the MEKK1-MKK1/2-MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol Plant* 2: 120–137.
- Posas, F.–Wurgler-Murphy, S. M.–Maeda, T.–Witten, E. A.–Thai, T. C.–Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* 86: 865–875.
- Pucciariello, C.–Banti, V.–Perata, P. (2012) ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiol Biochem* 59: 3–10.
- Qiu, Q. S.–Guo, Y.–Dietrich, M. A.–Schumaker, K. S.–Zhu, J. K. (2002) Regulation of SOS1, a plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger in Arabidopsis thaliana, by SOS2 and SOS3. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8436–8441.
- Qiu, Q. S.–Guo, Y.–Quintero, F. J.–Pardo, J. M.–Schumaker, K. S.–Zhu, J. K. (2004) Regulation of vacuolar Na⁺/H⁺ exchange in Arabidopsis thaliana by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *J Biol Chem* 279: 207–215.
- Reiser, V.–Raitt, D. C.–Saito, H. (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 161: 1035–1040.
- Rigo, G.–Ayaydin, F.–Tietz, O.–Zsigmond, L.–Kovacs, H.–Pay, A.–Salchert, K.–Darula, Z.–Medzihradzky, K. F.–Szabados, L.–Palme, K.–Koncz, C.–Cseplo, A. (2013) Inactivation of Plasma Membrane-Localized CDPK-RELATED KINASE5 Decelerates PIN2 Exocytosis and Root Gravitropic Response in Arabidopsis. *Plant Cell* 25: 1592–1608.
- Rigo, G.–Papdi, C.–Szabados, L. (2012) Transformation using controlled cDNA overexpression system. *Methods Mol Biol* 913: 277–290.
- Rus, A.–Lee, B. H.–Munoz-Mayor, A.–Sharkhuu, A.–Miura, K.–Zhu, J. K.–Bressan, R. A.–Hasegawa, P. M. (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol* 136: 2500–2511.
- Rus, A.–Yokoi, S.–Sharkhuu, A.–Reddy, M.–Lee, B. H.–Matsumoto, T. K.–Koiwa, H.–Zhu, J. K.–Bressan, R. A.–Hasegawa, P. M. (2001) AtHKT1 is a salt tolerance determinant that controls Na⁽⁺⁾ entry into plant roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14150–14155.
- Sakuma, Y.–Maruyama, K.–Osakabe, Y.–Qin, F.–Seki, M.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292–1309.
- Sakuma, Y.–Maruyama, K.–Qin, F.–Osakabe, Y.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006) Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 18822–18827.

- Santiago, J.–Dupeux, F.–Round, A.–Antoni, R.–Park, S. Y.–Jamin, M.–Cutler, S. R.–Rodriguez, P. L.–Marquez, J. A. (2009) The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 462: 665–668.
- Sato, A.–Sato, Y.–Fukao, Y.–Fujiwara, M.–Umezawa, T.–Shinozaki, K.–Hibi, T.–Taniguchi, M.–Miyake, H.–Goto, D. B.–Uozumi, N. (2009) Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* 424: 439–448.
- Scharf, K. D.–Berberich, T.–Ebersberger, I.–Nover, L. (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta* 1819: 104–119.
- Shi, H.–Ishitani, M.–Kim, C.–Zhu, J. K. (2000) The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6896–6901.
- Shi, H.–Lee, B. H.–Wu, S. J.–Zhu, J. K. (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in Arabidopsis thaliana. *Nat Biotechnol* 21: 81–85.
- Shi, H.–Quintero, F. J.–Pardo, J. M.–Zhu, J. K. (2002) The putative plasma membrane Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ antiporter SOS1 controls long-distance Na⁽⁺⁾ transport in plants. *Plant Cell* 14: 465–477.
- Sirichandra, C.–Gu, D.–Hu, H. C.–Davanture, M.–Lee, S.–Djaoui, M.–Valot, B.–Zivy, M.–Leung, J.–Merlot, S.–Kwak, J. M. (2009) Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* 583: 2982–2986.
- Strizhov, N.–Abraham, E.–Okresz, L.–Blickling, S.–Zilberstein, A.–Schell, J.–Koncz, C.–Szabados, L. (1997) Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. *Plant J* 12: 557–569.
- Suzuki, N.–Koussevitzky, S.–Mittler, R.–Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ* 35: 259–270.
- Szabados, L.–Kovacs, I.–Oberschall, A.–Abraham, E.–Kerekes, I.–Zsigmond, L.–Nagy, R.–Alvarado, M.–Krasovskaja, I.–Gal, M.–Berente, A.–Redei, G. P.–Haim, A. B.–Koncz, C. (2002) Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the Arabidopsis genome. *Plant J* 32: 233–242.
- Szabados, L.–Savoure, A. (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15: 89–97.
- Székely, G.–Ábrahám, E.–Cséplő, A.–Rigó, G.–Zsigmond, L.–Csiszár, J.–Ayaydin, F.–Strizhov, N.–Jasik, J.–Schmelzer, E.–Koncz, C.–Szabados, L. (2008) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* 53: 11–28.
- Teige, M.–Scheikl, E.–Eulgem, T.–Doczi, R.–Ichimura, K.–Shinozaki, K.–Dangl, J. L.–Hirt, H. (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol Cell* 15: 141–152.
- Tran, L. S.–Urao, T.–Qin, F.–Maruyama, K.–Kakimoto, T.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007) Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 20623–20628.

- Urao, T.–Yakubov, B.–Satoh, R.–Yamaguchi-Shinozaki, K.–Seki, M.–Hirayama, T.–Shinozaki, K. (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11: 1743–1754.
- Volkov, R. A.–Panchuk, I. I.–Mullineaux, P. M.–Schoffl, F. (2006) Heat stress-induced H(2)O(2) is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 61: 733–746.
- Wang, F.–Zeng, B.–Sun, Z.–Zhu, C. (2009) Relationship between proline and Hg²⁺-induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Arch Environ Contam Toxicol* 56: 723–731.
- Wang, Y.–Li, L.–Ye, T.–Lu, Y.–Chen, X.–Wu, Y. (2013) The inhibitory effect of ABA on floral transition is mediated by ABI5 in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 64: 675–684.
- Wohlbach, D. J.–Quirino, B. F.–Sussman, M. R. (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20: 1101–1117.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.–Shinozaki, K. (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251–264.
- Yang, Q.–Chen, Z. Z.–Zhou, X. F.–Yin, H. B.–Li, X.–Xin, X. F.–Hong, X. H.–Zhu, J. K.–Gong, Z. (2009) Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2: 22–31.
- Yoshida, T.–Sakuma, Y.–Todaka, D.–Maruyama, K.–Qin, F.–Mizoi, J.–Kidokoro, S.–Fujita, Y.–Shinozaki, K.–Yamaguchi-Shinozaki, K. (2008) Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 515–521.
- Yu, L.–Nie, J.–Cao, C.–Jin, Y.–Yan, M.–Wang, F.–Liu, J.–Xiao, Y.–Liang, Y.–Zhang, W. (2010) Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 188: 762–773.
- Zhu, J.–Verslues, P. E.–Zheng, X.–Lee, B. H.–Zhan, X.–Manabe, Y.–Sokolchik, I.–Zhu, Y.–Dong, C. H.–Zhu, J. K.–Hasegawa, P. M.–Bressan, R. A. (2005) HOS10 encodes an R2R3-type MYB transcription factor essential for cold acclimation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 9966–9971.
- Zhu, J. K. (2003) Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr Opin Plant Biol* 6: 441–445.
- Zimmermann, P.–Hennig, L.–Gruissem, W. (2005) Gene-expression analysis and network discovery using Genevestigator. *Trends Plant Sci* 10: 407–409.
- Zsigmond, L.–Rigo, G.–Szarka, A.–Szekely, G.–Otvos, K.–Darula, Z.–Medzihradsky, K. F.–Koncz, C.–Koncz, Z.–Szabados, L. (2008) *Arabidopsis* PPR40 connects abiotic stress responses to mitochondrial electron transport. *Plant Physiol* 146: 1721–1737.
- Zsigmond, L.–Szepesi, A.–Tari, I.–Rigo, G.–Király, A.–Szabados, L. (2012) Overexpression of the mitochondrial PPR40 gene improves salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Sci* 182: 87–93.
- Zsigmond, L.–Tomasskovic, B.–Deak, V.–Rigo, G.–Szabados, L.–Banhegyi, G.–Szarka, A. (2011) Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 49: 809–815.

VII. A növények stressztűrő képességének növelése génbeépítéssel

HORVÁTH GÁBOR

Összefoglalás

A folyamatosan növekvő élelmiszer-szükséglet kielégítéséhez elengedhetetlen a növénytermesztésben az új technológiák alkalmazása, melyeknek fontos eleme a növények környezeti stresszhatásokra adott válaszainak megismerése és az ismeretek gyakorlati felhasználása. A káros környezeti hatások közös tulajdonsága, hogy fellépésükkor megbomlik az egyensúly a szervezetben a reaktív vegyületek termelődése és az azok eltávolítására szolgáló védekezési hálózat kapacitása között. Az alábbi fejezetben a laboratóriumunkban évtizedek óta folyó kutatások két fontos területéről mutatunk be az agrár biotechnológiában is alkalmazható eredményeket. Elsőként a reaktív oxigén fajták keletkezésének visszaszorítását vizsgáljuk a sejten belüli vastárolás hatékonyságának növelésével; alátámasztva a megközelítés hasznosságát mind az abiotikus, mind a biotikus stresszek elleni védekezésben. A második részben a reaktív karbonil vegyületek enzimatisus eltávolításának lehetőségeit vizsgáljuk, kiemelve ebben a növényi aldo-keto reduktázoknak az alkalmazott kutatásban is bizonyított fontos szerepét.

Summary

To satisfy the continuously growing need for food, the application of the new technologies is essential in the agriculture; its important elements are the research on the plant's responses to the environmental stresses and the practical use of the gained knowledge. The common element of the harmful environmental effects is that the balance between the production of the reactive compounds and the capacity of a protective network being used for their removal gets disturbed. In the next chapter two of the important research areas of our laboratory are presented, both with application potential in the agro-biotechnology. Firstly the suppression of the formation of the reactive oxygen species by the increase of the efficiency of the intracellular iron storage will be examined; the results support the usefulness of the approach in defense against both abiotic and biotic stresses. In the second part the opportunities of the enzymatic removal of reactive carbonyl compounds are discussed, emphasizing the importance of plant aldo-keto reductases in this process, that has been proven not only in the basic, but also in the applied research.

A Föld népessége a jelenlegi 7 milliárdról 2050-re várhatóan 9 milliárdra növekszik. Ezt meghaladóan nő azonban a felhasznált energiahordozók mennyisége és az élelmiszer-szükséglet is, ez utóbbi a növénytermesztés hatékonyságának jelentős emelését igényli, mivel a megművelhető földterület nagysága limitált. A 2050-ig deklarált cél megvalósulásához, ami szerint az élelmiszer-termelést hetven százalékkal kell növelni, évenként hozzávetőleg 44 millió tonnával több gabonát kell betakarítani, méghozzá egyre romló környezeti feltételek (például a globális felmelegedés hatásai) mellett (FAO, 2009). Az általános felmelegedés természetesen Magyarországon is érezteti hatását, egyre melegebb nyaraink és aszályosabb éveink vannak, és a jövőbeni kilátások is a szárazság súlyosbodását mutatják. Ezt jelzi az is, hogy az utóbbi száz év legszárazabb éveinek közel fele az elmúlt évtizedre esik, a FAO szakértői szerint Magyarország jelentős termőterületei már most, illetve a közeljövőben a félsivatagos területek közé sorolhatók. Ezeknek a területeknek az öntözése (bár jelentős költségekkel) az aszály problémáját csökkentik, azonban ez a megoldás a talaj sókoncentrációjának növekedésével jár, így újabb, a termésmennyiséget csökkentő stressz-tényezőkkel kell számolnunk.

Érthető tehát, hogy egyre sürgetőbb az igény a növénytermesztés produktivitásának jelentős javítására; a hatvanas évek „zöld forradalmának” mintájára egy második, „zöld biotechnológiai forradalom” elindítására. A fentiek alapján ennek legfontosabb jelenlegi és jövőbeni feladata a termésmennyiség és a termésbiztonság növelése a romló környezeti feltételek között. Az általánosan elfogadott nézet szerint ez a modern növényi biotechnológia eszközeinek – mint a molekuláris markerek használata a nemesítésben és a génátvitel – hatékony alkalmazásával érhető el.

A növények stressztoleranciájának molekuláris szabályozása specifikus stressztűrési gének átíródásán és ennek pontos regulációján alapul. A géntermékek a stresszválaszok széles skálájában mutatnak aktivitást, ide tartoznak a jelátviteli mechanizmusok, a génátíródás szabályozása, az ozmotikus kiegyenlítés, a membránok és fehérjék védelme, valamint a szabadgyökök és a toxikus vegyületek hatástalanítása. Az utóbbi időben a növényi stresszválaszok mechanizmusainak megértése kezdi meghozni gyümölcsét: a kulcskomponensekkel kapcsolatos génátviteli megközelítések egyre gyakrabban találnak alkalmazásra gazdaságilag fontos növényekben is.

A stressztűrési növelésére képes gének azonosítását és azok izolálását követően lehetőség nyílik arra, hogy ezek hatását haszonnövényekben is értékeljük. Ehhez azonban az szükséges, hogy a megfelelő génbeviteli technikát is kiválasszuk, az izolált gént felhasználva pedig annak kifejeződését megfelelő módon biztosító konstrukciót építsünk fel. Az új stressztűrési gének bevitelének és az ezt követő növényregenerációnak a legáltalánosabban elterjedt módja a természetben is előforduló, agrobaktérium által közvetített géntranszfer (Barton és Chilton 1983). A nagy sebességű hordozórészecskék belövésén alapuló „részecske bombázás” (particle bombardment) módszere ugyancsak nagyon elterjedt, különösképp azoknak a növényeknek az esetében, melyek agrobaktériummal nem, vagy csak nagyon nehezen, alacsony hatásfokkal transzformálhatóak (mint például a kukorica) (Klein et al. 1989). Új transzformációs technikák, rendszerek állandó fejlesztés alatt vannak, így az agrobaktériummal nem

transzformálható növényfajták/genotípusok számára már rendelkezésre áll a *Rhizobiacea* családba tartozó, növény-asszociált baktériummal megvalósuló géntranszfer (Broothaerts et al. 2005).

A bevitt gén kifejeződését a gazdanövényben legáltalánosabb esetben a karfiol-mozaikvírus (CaMV) 35S promótere (amit általában kétszikű növényekben használnak), valamint az egyszikűekben használt actin 1 (*Act-1*) vagy a kukoricából származó, az *Ubi-1* gén intront is tartalmazó promótere biztosítja (Grover et al. 2003). Mivel ezek a promóterek konstitutív kifejeződést eredményeznek, a mögéjük illesztett transzgen minden szervben és fejlődési állapotban expresszál, ami általában szükségtelen (néhány esetben kifejezetten káros), és feleslegesen használja fel a növény metabolikus kapacitását. Ezért kívánatos az olyan indukálható promóterek használata, melyek a génkifejeződést csak a megfelelő esetben, a stressz felléptekor engedik meg (Su és Wu 2004). Nagy szükség van a génexpressziós tanulmányokból származó olyan információkra, melyek újabb és újabb ilyen promóterekkel irányított géneket azonosítanak; ez biztosítja az „adott stresszhez a megfelelő promótert” elv egyre hatékonyabb alkalmazását. Természetesen arra is külön figyelmet kell fordítani, hogy ezek az adott kifejeződést irányító szekvenciák mekkora specifitással és hatékonysággal működnek heterológ rendszerben, azaz más növénybe bejuttatva.

Az abiotikus hatásokkal szembeni ellenálló képesség növelésének legtöbb példáját modellnövények transzformációjával és a beépült gén hatásának vizsgálatával mutatuk be egészen a közelmúltig. A lúdfű (*Arabidopsis thaliana*), a dohány (*Nicotiana tabacum*), a lucerna (*Medicago sativa*) kiváló növények a célgének vizsgálatára, mivel a génbeépítés és növényregenerálás technikája teljesen kidolgozott és hosszú múltra tekint vissza, a lúdfű esetében pedig a különösen egyszerű transzformálási módszer egyedi transzgenikus növények ezreinek létrehozását teszi lehetővé rövid idő alatt (Clough és Bent 1998). A gyorsan növekvő, nagy levelű dohány a fotoszintetikus paraméterek mérésének és a biokémiai vizsgálatoknak jelent ideális alanyt. A mezőgazdaság legfontosabb haszonnövényei esetében (búza, árpa, rizs, kukorica, szója és gyapot) azonban csak az utóbbi években jelentek meg génbevitellel előállított stressztűrő fajták. A laboratóriumi és üvegházi körülmények között ígéretesnek mutakozó kísérleti növényekkel szemben itt különleges, bár alapvető követelmény fogalmazódik meg: nemcsak túl kell élniük a káros környezeti hatásokat, de megfelelő termésmennyiséggel és termésbiztonsággal kell rendelkezniük mind (közel) optimális, mind a stressz körülményei között. Nem mutakozhatnak meg a bevitt gén olyan hatásai, melyek a konvencionális nemesítési programokban gyakran jelentkeztek: a szárazság-ellenálló fajták produktivitása alacsonyabbnak bizonyult kontroll körülmények között, mint a szárazságérzékeny fajtáké (Mitra 2001). A génbevitel hasznosságát a mezőgazdasági növények esetében egyértelműen a szabadföldi körülmények között elért termésmennyiség határozza meg; ennek alapján dönthető el, hogy egy adott gén, jelátviteli vagy biokémiai út bír-e agrár biotechnológiai fontossággal.

Néhány sikeres megoldást már ismerünk, melyek bizonyítottak a gyakorlatban is. A lúdfű Y sejtmagi faktor családba tartozó AtNF-YB1 transzkripció faktor túltelmentetése a szárazságtűrés kialakításáért felelős gének bekapcsolásával képes csök-

kenteni a vízmegvonás káros hatását ebben a modellnövényben. A kukorica ortológ (ZmNF-YB2) megtalálása és túltermeltetése kukoricában hasonló fenotípust eredményezett. Kétéves szabadföldi összehasonlító teszt eredményei bizonyították, hogy kukoricában stabil, 10%-ot meghaladó termésmenyekeedést lehetett elérni a transzkripció faktor magas szinten történő termeltetésével, akár a jó termést biztosító második, akár az aszályos első év hozamát tekintjük (Nelson et al. 2007).

Egy másik sikeres aszálytűrő kukoricafajtát a Monsanto cég állított elő. Ez a fajta (a MON87460 jelű) egy bakteriális eredetű RNS dajkafehérjét (chaperone-t) termel. A *Bacillus subtilis* egyik hidegtűrési fehérjeje (CSPB) a hírvívő RNS-ek translációját segíti elő stressz körülmények között. Az ezt termelő kukorica bizonyítottan jobb termésátlagot produkált az Egyesült Államok számos vetésterületén, ahol megtalálhatóak voltak közel optimális vízellátottságú területek és félsivatagos, aszályos földek is. A konzekvensen megnövekedett termésmennyiség a fentebb említett kritérium teljesülését jelenti: sikerült nagyobb hozamot elérni mind a szárazságnak kitett, mind a kedvező adottságú helyeken (Castiglioni et al. 2008).

A fenti két példából is látható, hogy a stressztűrő képesség javítása eltérő módon (például védekező gének aktiválása vagy a transláció hatékonyságának növelése) elérhető, a jól tervezett üvegházi kísérletekben, egy stressztényező alkalmazásakor kapott biztató eredmények azonban nem jelentik azonnal azt, hogy a technológia a szántóföldön is megállja a helyét.

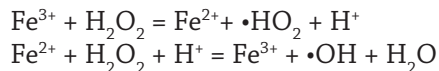
Az abiotikus és biotikus stressz közös velejárója, hogy hatásukra a reaktív vegyületek koncentrációja megnövekszik a szervezetben. A legfontosabb termésmennyiség-csökkentő környezeti hatások esetében is kimutatható az úgynevezett reaktív oxigén fajták (reactive oxygen species, ROS) keletkezése, ezek közé tartoznak a hidrogén-peroxid, különböző párosítatlan elektront tartalmazó gyökök, mint a szuperoxid gyökion, a hidroxilgyök és a nagyon reakcióképes, de nem gyök természetű szinglett oxigén. A fent említett molekulák eltérő élettartammal és reakcióképességgel rendelkeznek, ez, valamint hidrofil-lipofil tulajdonságuk határozza meg a sejten belüli terjedésüket. Nagyon fontos azoknak a molekuláris mechanizmusoknak a megértése, melyek a ROS keletkezését és felhalmozódását szabályozzák, valamint ezek szerepének tisztázása a stressz okozta károsodásokban; hiszen ezek alapján értékelhetjük hozzájárulásukat a növények fejlődésének és növekedésének irányításában és a stresszválaszban (Choudhury et al. 2013). Az olyan vegyületek, mint a hidrogén-peroxid, relatíve hosszú élettartamuknak és a mennyiségüket szabályozó specifikus enzimeknek (mint például a peroxidázok és a katalázok), valamint a transzkripció faktorok közvetlen módosításának köszönhetően jelátviteli funkciót is betöltenek, azonban magas koncentrációban minden ROS sejtkárosító hatású. Képesek reagálni olyan alapvető sejtalkotókkal, mint a DNS, fehérjék és lipidek, ezek a reakciók széles körű biokémiai, metabolikai és fiziológiai változásokat indukálnak. Ezeket összefoglaló néven „oxidatív stressznek” nevezzük. Oxidatív stressz minden aerob életformában fellép, a molekuláris oxigén használatának elkerülhetetlen következménye, ezért minden organizmusban – így a növényekben is – a védekező mechanizmusok széles körét találhatjuk meg. Ezek az antioxidáns rendszerek enzimatis és nem enzimatis folyamatok

hálózataként működve védik a sejtalkotókat az oxidatív károsodásoktól, azonban akut stressz esetén a rendszer túlterhelődik, és ennek végső következménye a sejt, illetve a szervezet pusztulása lehet. A növények oxidatív stresszel szembeni ellenálló képességének növelése ígéretes módszer mind az abiotikus, mind a biotikus hatások jobb hatásfokú kivédésének.

A kutatási irányt meghatározó kísérletek elkezdése Deák Mária nevéhez fűződik. Ő tanulmányozta azokat a géneket, amelyek kifejeződése jelentősen megemelkedik a lucerna RA3 sejt kultúrában, a szomatikus embriogenezishez szükséges magas (10 mg/l) szintetikus auxin hozzáadása hatására. Az alkalmazott (2,4-diklórfenoxi) ecetsav (2,4-D) kisebb koncentrációban auxin hatású vegyület, magasabb, a szomatikus embriogenezishez alkalmazott mennyiségben azonban már stresszválaszt indukál. Nem véletlenül alkalmazzák a kétszikű gyomok elleni herbicidként, ez volt az egyik hatóanyaga a Vietnamban defoliánsként alkalmazva hírhedtté vált „Agent Orange”-nak is. A kezelés hatására számos gén kifejeződése megemelkedett, ezek közé tartoztak többek között a lucerna ferritin (*MsFer*) és aldóz redukáz (*MsALR*) gének.

A ferritin olyan vastároló fehérje, melynek homológjai a legtöbb organizmusban megtalálhatók a baktériumoktól az emlősökig. A sejten belüli, nem enzimekhez és fehérje komplexekhez kötött vas nem szabad formában, hanem tároló fehérjékben (mint a ferritin) van jelen. Ennek oka a biokémiai oxidációs folyamatok és az oxidatív stressz során keletkező hidrogén-peroxid és a szabad $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ kölcsönhatásában keresendő: az úgynevezett Fenton-reakcióban (lásd az alábbi egyenleteket) a hidrogén-peroxidnál jóval reakcióképesebb (így károsabb) hidroxil és szuperoxid gyökök keletkeznek.

A Fenton-reakció folyamata:



A keletkezett gyökök reakcióképességét jól példázza, hogy a fenti reakció a mérgező szerves hulladékokat tartalmazó szennyvizek ártalmatlanításának ma is használt módszere. Érthető tehát, hogy a biológiai rendszerekben a szabad vasionok és a hidrogén-peroxid találkozása mindenképpen elkerülendő, ezt valósítja meg a vas biztonságos ferritin burokokban történő tárolása. A növényi ferritin fő előfordulási helye a kloroplastisz, mely egyben a sejt fő ROS forrása is. Normális növekedési körülmények között a ferritin fehérje mennyisége a vegetatív szövetekben alacsony, ez csak a magokban, az embriók érése során nő meg. A növényi ferritin termelődése transzkripciós és mRNS stabilitási kontroll alatt áll, szintje jelentősen megnövekszik vaskezelés, abszcizinsav hozzáadása és oxidatív stressz hatására.

Egyes gének fiziológiai szerepének vizsgálatára jó eszköz a funkcióvesztéses mutánsok tanulmányozása (ha ilyen rendelkezésre áll), vagy túltermelő transzgenikus növények létrehozása génbeépítéssel. A lucerna ferritinnel kapcsolatos kutatás következő lépése olyan transzformáns dohánynövények létrehozása volt, melyek kezeléstől és fejlődési állapottól függetlenül folyamatosan termelték a lucerna *MsFer* fehérjét

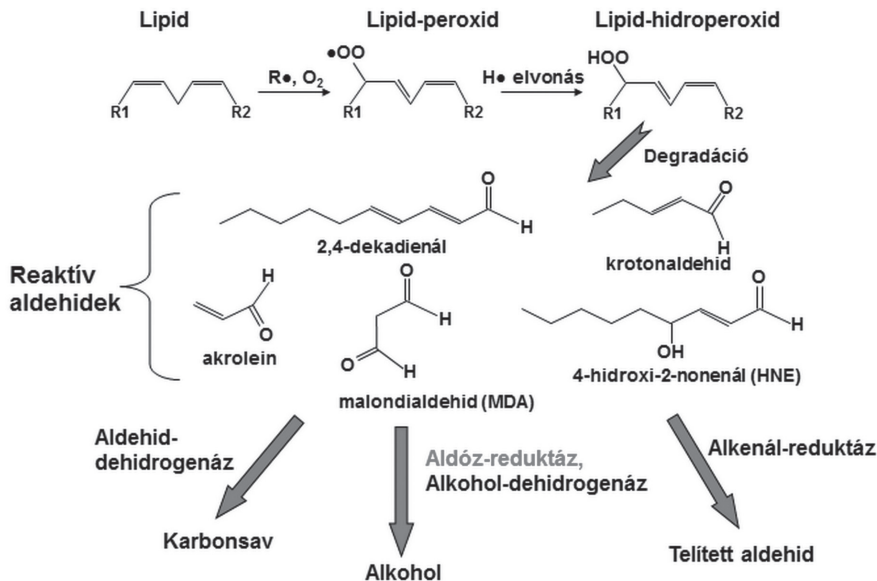
(Deák et al. 1999). A vizsgált növények két csoportjában a ferritin sejten belüli elhelyezkedése eltérő volt: míg az egyik esetben a fehérje (a természetes lokalizációnak megfelelően) a kloroplasztiszba vándorolt, és érett formája itt halmozódott fel; addig a másik csoportban a fehérje (egy mesterségesen elrontott kloroplasztisz tranzitpeptidnek köszönhetően) éretlen formájában a citoplazmában maradt. A transzformánsokkal végzett élettani kísérletek először arra irányultak, hogy bizonyítsuk a ferritin túltermelésének előnyös voltát a növényekben mind magas koncentrációjú vasionok jelenlétében, mind direkt oxidatív stressz körülményei között. Az utóbbit paraquat herbicid kezeléssel értük el, mely vegyület a fotoszintetikus elektrontranszportban szállított elektronokat a molekuláris oxigénnek adja át, ROS képződését indukálva ezzel. A lucerna ferritint termelő dohánynövények mindkét kezeléssel szemben magasabb toleranciát mutattak, bizonyítva ezzel az előfeltevésünket. Meglepő módon azonban nem találtunk különbséget a fehérjét a citoszólban és a kloroplasztiszban felhalmozó növények között, ami talán arra engedhet következtetni, hogy a citoplazmában lévő szabad vas megkötése ugyancsak előnyös a növény szempontjából (Deák et al. 1999). Hasonlóan viselkedtek a két transzformáns csoportba tartozó növények abban az esetben is, amikor a patogénnel szembeni ellenálló képességüket vizsgáltuk. Ha a transzformánsokat dohány nekrozis vírussal (TNV) fertőztük, kevesebb nekrotikus lézió fejlődött ki ezeken, mint a kontroll növényeken. Az *Alternaria alternata* és *Botrytis cinerea* patogén gombákkal történő fertőzéses kísérletben a transzformáns növények ugyancsak csökkent nekrozist mutattak (Deák et al. 1999). A léziók és nekrotizált levélfelület kialakulásának egyik feltétele ezekben az esetekben a reaktív oxigén formák robbanásszerű felszaporodása (az ún. „oxidative burst”), érthető tehát, hogy az ezek keletkezését katalizáló szabad vas megkötése ezt a folyamatot visszaszorítja. Különösen hasznos lehet ez a nekrotrof patogénnel szemben, amelyek az elhalt szöveteket használják szén- és nitrogénforrásként. A vaskötő fehérjék szerepe a növény-patogén kapcsolatban szerteágazó és máig nem teljesen tisztázott kérdés. Modellként alkalmazva az *Arabidopsis thaliana*-*Erwinia chrysanthemi* rendszert megállapítható volt, hogy az enterobaktérium a hatékony fertőzéshez két, nagy affinitású vas sziderofór termelődését igényli, melyek nemcsak vastárolóként működnek, de a baktériumot is védik az oxidatív stressztől (Boughammoura et al., 2007). A lúdfű saját ferritin génje (*AtFer1*) indukálódik a chrysobactin bakteriális sziderofór vashiányos formája hatására, mutatva ezzel azt, hogy a növény saját ferritinjébe zárva próbálja elvonni a vasat a baktériumtól. A ferritin szerepét a patogén rezisztenciában tovább erősíti az a tény, hogy a lúdfű *AtFer1* hiányos mutánsa megnövekedett érzékenységet mutat az *E. chrysanthemi* fertőzéssel szemben. A ferritin túltermelésének hatása a növények mikrobiális kapcsolatára túlmutat ezeken a példákon; ismert, hogy a ferritin túltermelése és ennek következményeként a transzformáns dohányok megemelkedett vasfelvétele jelentősen csökkenti a talajban hozzáférhető vas mennyiségét, és ezzel képes megváltoztatni a rizoszféra mikrobiális összetételét (Robin et al. 2007).

A MsFer fehérjét termelő és azt a kloroplasztiszban felhalmozó dohányok további vizsgálata megerősítette azokat a feltevéseket, hogy a ROS szint csökkentésének ez az útja több környezeti hatással szemben is ellenállóbbá teszi a növényeket. Tudott

az, hogy a fagyponthoz feletti, de alacsony (0 °C körüli) hőmérséklet a fotoszintetikus apparátus által hasznosítani képtelen magas fényintenzitással párosulva erős oxidatív stressz kiváltója. A fotoinhibíció ekkor a Calvin-ciklus enzimreakcióinak lelassulására vezethető vissza, ami a sejten belül a redukáló ágensek csökkent koncentrációját, hiányát eredményezi. Jelentősen megnő a hidrogén-peroxid szintje, ami vaskatalizált hidroxilgyök képződéséhez vezet. A lucerna ferritint termelő dohány-növényekben csökken a katalizátorként működő szabad vas mennyisége, így a Fenton-reakció bekövetkezésének valószínűsége is. Ezzel a sejtekben fellépő oxidatív stressz is visszaszorul, ami az alacsony hőmérséklet indukált fotoinhibícióval szembeni jobb toleranciában nyilvánult meg (Hegedűs et al. 2008). A MsFer termeltetése és kloroplasztiszba történő targetálása a transzformált búzanövényekben kevesebb sikerrel járt. Részint a gén kifejeződése nem volt elég magas szintű, részint a két-szikú-egyszikú tranzit peptidok különbözősége nem biztosította a búza plasztiszban történő felhalmozódás magas szintjét. Sajnálatos ez azért is, mivel a ferritin védős szerepe valószínűsíthető a szárazság és a magas sókoncentráció által okozott stressz során is, legalábbis erre lehet következtetni a ferritin gén kifejeződésének növekedéséből, illetve a fehérje felhalmozódását mutató adatokból e két stressz körülményei között (Gao et al. 2011; Kang és Udvardi 2012).

Szőlő esetében a transzformációs kísérlet és a transzformánsok elemzése biztató, ám néhány esetben váratlan eredménnyel is járt. A Richter 110 szőlőfajta eredményes transzformációja számos, a lucerna ferritint magas szinten termelő növény vizsgálatát tette lehetővé. Ezekben kimutattuk a paraquat okozta direkt oxidatív stresszel és egy kis molekulájú, a membránok lipidjeinek károsodását modellező vegyülettel (*tert*-butil-hidroperoxid, *t*-BHP) szembeni jobb toleranciát (Zok et al. 2010). Ez utóbbi eredményt közvetlenül összefüggésbe hozhatjuk a szabad vas mennyiségének csökkenésével, mert (mint ahogyan a membrán oxidatív károsodásakor keletkező lipid hidroperoxidok is) a *t*-BHP szabad vas jelenlétében igen reaktív ferril(IV)-központú gyökök képződését segíti elő. A MsFer fehérjét termelő szőlők levelén kimutatható volt az irodalmi adatok alapján már megjósolható tolerancia a tápoldat magas sókoncentrációjával szemben is (Zok et al. 2010). Mindezek az eredmények bizonyították a kloroplasztiszban akkumulálódó ferritin stressztoleranciát növelő hatását. A citoplazmában felhalmozódó MsFer fehérje azonban nem várt fenotípust eredményezett. A transzformációhoz használt konstrukció megegyezett az előzetesen dohány esetében használttal, abban az esetben oxidatívstressz-toleranciát és patogénrezisztenciát tapasztaltunk a normál körülmények között a transzformálatlan SR1 dohánnytól megkülönböztethetetlen fenotípusú transzformánsokon (Deák et al. 1999). A szőlő esetében a citoplazmás ferritin felhalmozódás azonban minden esetben retardált növekedéshez és törpe levelek kifejlődéséhez vezetett (1. ábra). A tapasztalt jelenség jól példázza azt, hogy az egyik növényfajban hasznosnak bizonyuló génbeültetési technológia nem alkalmazható automatikusan lemásolva más fajok esetében.

Az oxidatív stressz közvetlen megnyilvánulása a ROS és a biomolekulák között lejátszódó kémiai reakciók tömege. Különösen kitettek az oxidációnak a lipid membránok telítetlen zsírsavjai, ezek oxidatív módosítása egy reakciólánc végén többek kö-



2. ábra. A lipidperoxidáció reakciútja és a keletkező reaktív aldehidek eltávolításának néhány módja

zött kis molekulájú aldehidek keletkezéséhez vezet (2. ábra). A folyamat jól ismert, egyik végtermékét, a malondialdehydet általánosan használják az organizmusokban végbemenő oxidatív stressz mérésére, mivel tiobarbitursavval képzett színes adduktja könnyen és érzékenyen mérhető fotometriásan (TBARS teszt). A reakció során keletkező aldehidek között számos olyan van, ami α,β helyzetű kettős kötést tartalmaz, ezek különösen reakcióképesek. Ezeknek tudható be az oxidatív stressz sejtkárosító hatásainak jelentős része: mivel nem gyökös vegyületek, ezért sejten belüli élettartamuk nagyobb, könnyen vándorolhatnak és különösen jelentős fehérjemódosító képességgel rendelkeznek. A cisztein tiolcsoportja, a hisztidin imidazolgyűrűje, a lizin és az arginin aminosocsoportjai mind célpontjai a reaktív aldehideknek; hatásukra az enzimek elvesztik aktivitásukat, a szerkezeti fehérjék lebonthatatlan aggregátumokká állnak össze. Mindezen módosítások bekövetkeztét és ezek káros következményeit nevezzük összefoglaló néven karbonil stressznek. Mivel a karbonil stressz része és velejárója az oxidatív stressznek, ezért az élő szervezetekben a ROS eltávolításához hasonlóan számos mechanizmus működik a reaktív aldehidek eliminálására vagy reakcióképességük csökkentésére. Keletkezésük valószínűségét jelentősen csökkenti a membránok oxidációjakor képződő lipid hidroperoxidok azonnali redukciója peroxiredoxinokkal és glutation peroxidázokkal. Az aldehyd dehidrogenázok az oxocsoportot karboxilcsoporttá oxidálják; az alkohol dehidrogenázok, aldehyd és aldóz reduktázok pedig a megfelelő alkohollá redukálják. Az α,β helyzetű kettős kötést az alkenál reduk-

tázok telítik; mindezek a reakciók jelentősen csökkentik a reaktív aldehidek toxicitását (2. ábra). Specifikus glutation-S-tranzferázok által katalizált módon keletkeznek olyan aldehyd-glutacion adduktok, melyek aktív módon transzportálódnak ki a sejtből (Grimsrud et al. 2008). A felsorolt mechanizmusok mind a karbonil stressz kivédését szolgálják, azonban hasonlóan a ROS elimináló rendszerekhez, tartós és erős stresszhatás esetén ezek is túltelítődnek. Így a védekezési hálózat erősítése, egyes elemeinek fokozottabb termelése javíthatja a környezeti stresszhatásokkal szembeni ellenálló képességet. Ezt a célt szolgálja a bevezetőben említett kísérletben izolált második gén, a lucerna aldóz redukáz (*MsALR*) beépítése más növények genomjába.

A *MsALR* az aldo-keto redukáz enzimcsalád növényi képviselője. A család tagjai monomer állapotban aktív NADPH-függő oxidoreduktázok, melyek a baktériumoktól az emlősökig minden élőlényben előfordulnak. Az enzimek a NADP-kötő motívum konzervált szerkezete miatt hasonló struktúrájúak, széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek (a legkisebb telítetlen aldehidtől [akrolein] a prosztaglandin F_2 prekursoráig), így számos metabolikus folyamatban vesznek részt. A már említett kiindulási kísérletből valószínűsíthető volt a lucerna *MsALR* gén kifejeződésének növekedése különböző stressztényezők hatására, ennek igazolása történt meg először (Oberschall et al. 2000). Kiderült, hogy a génexpresszió megnövekszik a növényi stresszhormon, az abszcizinsav hatására, de ugyancsak indukálta a gén kifejeződését a nehézfém, ozmotikum, hidrogén-peroxid-kezelés és a szárazságstressz is. A bakteriális rendszerben kifejeztetett és tisztított rekombináns fehérje felhasználásával ellenanyagot állítottunk elő, ezzel sikerült bizonyítani a stresszkezelések hatására megnövekedett *MsALR* szintet, valamint azt, hogy a fehérje a növény minden vizsgált részében előfordul, így általános funkciója lehet. Az aldóz redukáz enzim szerepe a poliolt útban jól ismert; ennek első lépését, a glükóz szorbitollá történő redukcióját katalizálja. Azt, hogy hasonló szerepe van-e a lucerna enzimnek is, részint a tisztított rekombináns fehérjén történt enzimkinetikai mérések, részint a transzformáns dohánynövényeken elvégzett vizsgálatok válaszolták meg. Az enzimaktivitás-mérések igazolták, hogy a *MsALR* ténylegesen NADPH-t használ a szubsztrátok redukciójára, azonban lényegesen jobb katalizátora a kismolekulájú aldehidek (mint a 4-hidroxiionon-2-enál és az oxoaldehid metilglioxál) reakciójának, mint a glükóz szorbitollá történő átalakításának (Oberschall et al. 2000). Ezzel együtt igazolódott az is, hogy azokban a transzformáns dohánynövényekben, melyek a *MsALR* gént az erős, konstitutív kifejeződést biztosító CaMV35S promóter szabályozása alatt expresszálták, nincs jelentős mennyiségű szorbitolfelhalmozódás. A *MsALR* fehérjét felhalmozó növények oxidatívstressz-kezelésének eredményei azt mutatták, hogy a hidrogén-peroxiddal vagy paraquattal kezelt transzformánsok a kontrollnál számottevően ellenállóbbak, ezt a levelek fotoszintetikus aktivitása, illetve a gyökereken mért reaktív aldehyd szintek támasztották alá. A növényeken végzett vízmegvonási kísérletek mutatták meg a legszemléletesebb módon a *MsALR* gén bevitelének hasznosságát. A transzformáns növények fotoszintetikus aktivitása gyakorlatilag változatlan maradt a 35 napos vízmegvonás alatt, és a 10 napos újraöntözés a növények regenerálódásához vezetett, míg a kontrollnövények elszáradtak (3. ábra). A transzformáns növényekben a száraz-

ságstressz alatt felhalmozódott reaktív aldehidek mennyisége a MsALR enzimaktivitásának köszönhetően jelentősen alacsonyabb volt a kontroll SR1 dohányokban mérhetőnél (Oberschall et al. 2000).

A szántóföldön gyakran előforduló stressz körülmények kombinációjának hatását vizsgáltuk a következő kísérletekben (Hideg et al. 2003). Az erős UV-B besugárzás és az aszály gyakran fordul elő együtt a késő tavaszi-nyári periódusban a természetes környezetben, így a génátviteli technika alkalmazhatóságát jól vizsgálhatja az ilyen párosítást tartalmazó kísérleti rendszer. Az eredmények közül természetesen kiemelendő az, hogy a MsALR-termelő növények jobb fotoszintetikus aktivitást mutattak mind az egyszeres, mind az összetett stresszkezelés során. Jól látható volt az is a mérésekből, hogy a tolerancia egy fontos oka a reaktív aldehidek mennyiségének csökkenése, biokémiaiilag ez volt a legkövetkezetesebben kimutatható különbség a transzformáns és a kontroll növények között. Érdekes volt azonban annak észlelése is, hogy a MsALR enzim termelésének következményeként a növényekben megváltozott a mérhető ROS-szint (néhány kezelési körülmény esetében szignifikánsan), azaz a jobb fotoszintetikus aktivitás és a növény stressztoleranciájának növekedése erre a paraméterre is hatott (Hideg et al. 2003).

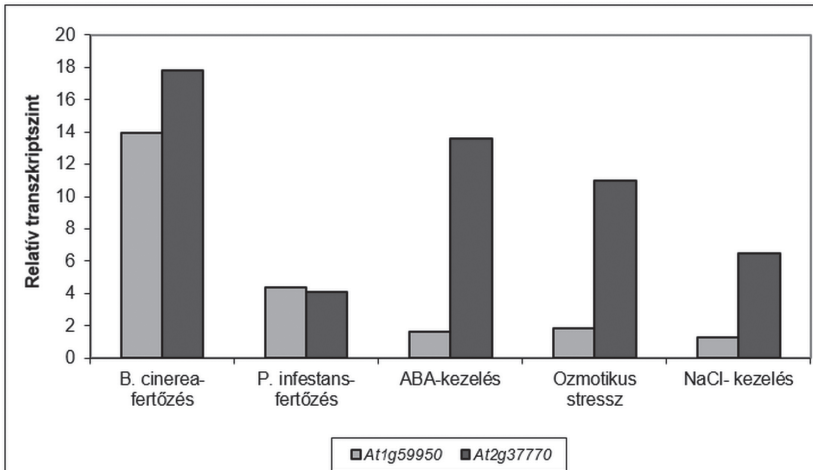
Más, a ROS-képződést és a lipidperoxidációt elősegítő stresszkezelés esetén is ellenállóbbnak bizonyultak a transzformáns dohánynövények. Mint azt a lucerna ferritinnel foglalkozó részben is említettem, az alacsony hőmérsékletű fotoinhibíció és a kadmium-kezelés hatására is ROS képződik a növényi sejtekben, és ennek nyomán erőteljes lipidperoxidáció indul meg. Míg a ferritin a reaktív oxigén formák (különösenként a hidroxilgyökök) keletkezését szorítja vissza, az aldóz redukáz a lipidperoxidáció aldehid jellegű toxikus termékeit redukálja. Mindkét esetben az eredmény a stresszel szembeni megnövekedett ellenálló képesség lesz, amit a MsALR termelő dohányokon is sikerült kimutatni (Hegedűs et al. 2004).

Nemcsak az alacsony, de a magas hőmérséklet is ROS- és reaktív aldehid keletkezést elősegítő biofizikai-biokémiai változásokhoz vezet (Yamauchi et al. 2008). A rizs aldo-keto redukázok funkcionális analízise során ezt a stressztényezőt is bevontuk a vizsgálatokba. Természetes választás volt ez, hiszen a legnagyobb termés kiesést okozó nyári aszályok fő komponenseivel (vízhiány, magas hőmérséklet, erős UV-B-sugárzás) szembeni toleranciát mint az aldóz redukáz termelő növények legfontosabb tulajdonságát így teljességében vizsgáltuk. A magas hőmérséklettel szembeni jobb tűrőképességet már a MsALR génnel transzformált dohányok esetében is kimutattuk (4. ábra). Fontos kutatási célunk volt az egyszikű növényből származó enzim védőfunkciójának vizsgálata is, így a kísérletekhez használt aldóz redukáz gént (*OsAKR1*) rizsből izoláltuk (Turóczy et al. 2011). A genom szekvenálás eredményének publikálása, e szekvenciák megjelenése a kereshető adatbázisokban nagyban felgyorsította a rizs ortológ azonosítását és klónozását. A biokémiai analízis a rizs és lucerna enzimek nagyfokú hasonlóságát mutatta a szubsztrátok kiválasztásában és a redukciójuk sebességében. A rizs aldóz redukáz esetében sikerült bizonyítanunk először, hogy szubsztrátként elfogadja és hatékonyan redukálni képes mind a lipidperoxidációból származó malondialdehid, mind a glikolitikus metilglioxál vegyületet.

A külsőleg adott metilglioxállal szembeni ellenálló képességet jól mutatta a transzformáns dohánynövények jobb növekedése e körülmények között.

A génbeviteli technika eredményességét elsősorban a legfontosabb haszonnövényeink esetében érdemes tesztelnünk. Az évtizedekre visszanyúló együttműködés a Gabonakutató Non-Profit Kft. kutatóival tette lehetővé a *MsALR* gént kifejező búzánövények létrehozását és azok vizsgálatát a Szegedi Biológiai Kutatóközponttal közösen kialakított és folyamatosan fejlesztett stresszdiagnosztikai rendszerben. A stabil transzformánsokon végzett vizsgálatok igazolták azt, hogy a vízmegvonásnak kitett növények esetében a növényenkénti szemtömeg jelentősen több a kontrollnövények értékénél (Fehér-Juhász et al. 2014). A hasonló árpa transzformánsok esetén egy új technikát, a fluoreszcens fehérjék használatával történő stressztolerancia-becslést alkalmaztuk sikeresen különböző kezelések mellett, majd azt vizsgáltuk, hogy a termelt aldóz redukáz sejten belüli lokalizációjának milyen szerepe van a stressztűrés megváltozásában (Nagy et al. 2013).

A lucerna ferritin és aldóz redukáz gének, elég érthető módon, „testvéreknek” tűnnek már a kezdeti izolálásuk pillanatától. Ugyanabban a kísérletben tűntek elő mint stressz hatására felülreprezentált hírvívő RNS-ek, reaktív vegyületek koncentrációjának csökkentése a direkt vagy indirekt feladatuk; bevitelük dohánynövénybe széles spektrumú stressztoleranciát eredményezett jellemzően hasonló körülmények (alacsony hőmérsékletű fotoinhibíció, nehézfémkezelés stb.) között vizsgálva. Ilyen párosításban azonnal szembetűnik az, hogy a számos *MsALR* transzformáns fajta meglétének ellenére a patogénrezisztencia ebben az esetben nem került a vizsgálatok célkeresztjébe, pedig a szakirodalomban egyre növekvő azon utalások száma, melyek a reaktív aldehidek hatékony eltávolításának fontosságát jelzik a biotikus stressz



5. ábra *Arabidopsis thaliana* aldó-keto redukáz gének expressziós változása biotikus és abiotikus stressz, valamint ABA-kezelés hatására a *Genevestigator* adatbázisban talált adatok alapján. Kontroll-esetben a gén transzkriptszintje = 1

esetében is. Az *A. thaliana* egyes aldóz redukáz génjeinek kifejeződése is sugallja az enzim fontosságát patogén fertőzések esetén. Érdekes adat, hogy míg néhány gén (mint például az *At1g59950*) kifejeződése csak biotikus stressz hatására emelkedik meg, más esetekben (*At2g37770*) a gén expressziója a biotikus és az abiotikus stresszhatásokra egyaránt válaszol (5. ábra). Sajnálatos, hogy a vizsgálatok és a molekuláris háttér pontos elemzésének elvégzésére még nem sikerült megfelelő forrást biztosítani, a jövőben remélhetőleg ez a fontos kérdés is megválaszolásra kerül.

A bevezetőben említettek szerint ezeknek az új haszonnövényfajtáknak szántóföldi tesztjei szolgáltatnák az igazi bizonyítékot hasznosságukra, a bevitt gén laboratóriumi körülmények között igazolt szerepének termésmennyiséget és termésbiztonságot növelő hatására. Reményeink szerint ezek a vizsgálatok a közeljövőben elvégzésre kerülnek, eredményeik pedig megadják majd az általunk alkalmazott technika valós értékét.

Felhasznált irodalom

- Barton, K. A.–Chilton, M. D. (1983) *Agrobacterium* Ti plasmids as vectors for plant genetic engineering. *Methods Enzymol* 101: 527–539.
- Boughammoura, A.–Franza, T.–Dellagi, A.–Roux, C.–Matzanke-Markstein, B.–Expert, D. (2007) Ferritins, bacterial virulence and plant defence. *Biometals* 20: 347–353.
- Broothaerts, W.–Mitchell, H. J.–Weir, B.–Kaines, S.–Smith, L. M. A.–Yang, W.–Mayer, J. E.–Roa-Rodríguez, C.–Jefferson, R. A. (2005) Gene Transfer to Plants by Diverse Species of Bacteria. *Nature* 433: 629–633.
- Castiglioni, P.–Warner, D.–Bensen, R. J.–Anstrom, D. C.–Harrison, J.–Stoecker, M.–Abad, M.–Kumar, G.–Salvador, S.–D’Ordine, R.–Navarro, S.–Back, S.–Fernandes, M.–Targolli, J.–Dasgupta, S.–Bonin, C.–Luethy, M. J.–Heard, J. E. (2008) Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol* 147: 446–455.
- Choudhury, S.–Panda, P.–Sahoo, L.–Panda, S. K. (2013) Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Sig Behav* 8: e23681.
- Clough, S. J.–Bent, A. F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743.
- Deák, M.–Horváth, V. G.–Davletova, S.–Török, K.–Sass, L.–Vass, I.–Barna, B.–Király, Z.–Dudits, D. (1999) Plants ectopically expressing the ironbinding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nat Biotechnol* 17: 192–196.
- FAO Declaration of the World Summit on Food Security, Rome; 16–18 November 2009. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/Meeting/018/k6050e.pdf>.
- Fehér-Juhász, E.–Majer, P.–Sass, L.–Lantos, Cs.–Csiszár, J.–Turóczy, Z.–Mihály, R.–Mai, A.–Horváth, G. V.–Vass, I.–Dudits, D.–Pauk, J. (2014) Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. *Acta Physiol Plant* 36: 663–673.

- Gao, L.–Yan, X.–Li, X.–Guo, G.–Hu, Y.–Ma, W.–Ían, Y. (2011) Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochem* 72: 1180–1191.
- Grimsrud, P. A.–Xie, H.–Griffin, T. J.–Bernlohr, D. A. (2008) Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes. *J Biol Chem* 283: 21837–21841.
- Grover, A.–Aggarwal, P. K.–Kapoor, A.–Katiyar–Agarwal, S.–Agarwal, M.–Chandramouli, A. (2003) Addressing Abiotic Stresses in Agriculture Through Transgenic Technology. *Curr Sci* 84: 355–367.
- Hegedűs, A.–Erdei, S.–Janda, T.–Tóth, E.–Horváth, G.–Dudits, D. (2004) Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Sci* 166: 1329–1333.
- Hegedűs, A.–Janda, T.–Horváth, V. G.–Dudits, D. (2008) Accumulation of overproduced ferritin in the chloroplast provides protection against photoinhibition induced by low temperature in tobacco plants. *J Plant Physiol* 165: 1647–1651.
- Hideg, É.–Nagy, T.–Oberschall, A.–Dudits, D.–Vass, I. (2003) Detoxification function of aldose/aldehyde reductase during drought and ultraviolet-B (280–320 nm) stresses. *Plant Cell Environ* 26: 513–522.
- Kang, Y.–Udvardi, M. (2012) Global regulation of reactive oxygen species scavenging genes in alfalfa root and shoot under gradual drought stress and recovery. *Plant Signal Behav* 7: 539–543.
- Klein, T. M.–Kornstein, L.–Sanford, J. C.–Fromm, M. E. (1989) Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiol* 91: 440–444.
- Mitra, J. (2001) Genetics and Genetic Improvement of Drought Resistance in Crop Plants. *Curr Sci* 80: 758–763.
- Nagy B.–Majer P.–Mihály R.–Dudits D.–Horváth V. G. (2013) Fluoreszcencia detekciós módszeren alapuló szárazság stressz tolerancia vizsgálatok a lucerna aldóz redukáz fehérjét (MsALR) termelő árpa növényeken. *Növényterm* 62: 53–72.
- Nelson, D. E.–Repetti, P. P.–Adams, T. R.–Creelman, R. A.–Wu, J.–Warner, D. C.–Anstrom, D. C.–Bensen, R. J.–Castiglioni, P. P.–Donnarummo, M. G.–Hinchey, B. S.–Kumimoto, R. W.–Maszle, D. R.–Canales, R. D.–Krolikowski, K. A.–Dotson, S. B.–Gutterson, N.–Ratcliffe, O. J.–Heard, J. E. (2007) Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 16450–16455.
- Oberschall, A.–Deák, M.–Török, K.–Sass, L.–Vass, I.–Kovács, I.–Fehér, A.–Dudits, D.–Horváth, G. V. (2000) A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant J* 24: 437–446.
- Robin, A.–Mazurier, S.–Mougel, C.–Vansuyt, G.–Corberand, T.–Meyer, J.-M.–Lemanceau, P. (2007) Diversity of root-associated fluorescent pseudomonads as affected by ferritin overexpression in tobacco. *Environ Microbiol* 9: 1724–1737.
- Su, J.–Wu, R. (2004) Stress-inducible Synthesis of Proline in Transgenic Rice Confers Faster Growth under Stress Conditions than that with Constitutive Synthesis. *Plant Sci* 166: 941–948.

- Turóczy, Z.–Kis, P.–Török, K.–Cserháti, M.–Lendvai, Á.–Dudits, D.–Horváth, V. G. (2011) Overproduction of a rice aldo–keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification. *Plant Mol Biol* 75: 399–412.
- Yamauchi, Y.–Furutera, A.–Seki, K.–Toyoda, Y.–Tanaka, K.–Sugimoto, Y. (2008) Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat stressed plants. *Plant Physiol Biochem* 46: 786–793.
- Zok, A.–Oláh, R.–Hideg, É.–Horváth, V. G.–Kós, P. B.–Majer, P.–Váradi, G.–Szegedi, E. (2010) Effect of *Medicago sativa* ferritin gene on stress tolerance in transgenic grapevine. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 100: 339–344.

VIII. Visszatekintő a tengeri szegedi szövettenyésztéséről

MÓRO CZ SÁNDOR

Összefoglaló

A kukorica szegedi szövettenyésztésének nemzetközi sikere a múlt század vége felé összenőtt a nevezetes születésnapját ünneplő elhivatott kutató, tudományos szervező Dudits Dénes kivételes tevékenységével. Szegeden az akkori Gabonatermesztési Kutatóintézet és az MTA Szegedi Biológiai Központja, valamint a német Höchst AG igen jól egészítette ki egymást ahhoz, hogy ennek eredményeként a világon az egyik első öröklődő génmódosított (GM) kukoricát létrehozza. Miközben Európában visszafogás jellemző a GM növények termesztésében, addig másutt a világon a hozzájárulásunkkal előállított génbeépülési eseményt millió hektárokon termesztik többszörös fajidegen génbeépülést hordozó kukoricahibridekben. A kukorica sikeres szövettenyésztéséhez megfelelő fajta szükséges, amelyeket ma leginkább a különféle génbeviteli módszerekben alkalmaznak. A Gabonakutatóban a génmódosítás mellett inkább a nemesítési alkalmazhatóság egyéb megoldásával foglalkoztunk. Állítottunk elő kukorica-búza hibridet testi sejtek fúziójával, és fejlesztettük a kifejletlen kukoricapollenből szövettenyésztéssel történő vonal-előállítás, amivel a kukoricanesímés hosszadalmas folyamata rövidíthető.

Summary

Co-operative efforts lead to patent applications on routine fertile plant differentiation from single cell cultures of maize, and their heritable transformation with a gene construct following naked DNA delivery to them (EP/23.06.90/ EP 90111945; EP/23.06.90/ EP 90111946; Donn et al. 1990, Abstracts VII. Int. Congr. PTCC, Amsterdam, June 24-29, 1990. p.53). The research team comprising persons from the former Cereal Research Institute, Szeged (CRC), Hungary (J. Németh; S. Mórocz), Biological Research Centre, Szeged, Hungarian Academy of Sciences (D. Dudits), and Hoechst AG, Frankfurt a. M. Germany (G. Donn) with their joined particular expertise and facilities was able to establish one of the first genetically modified maize plants applicable in breeding and growing in the world (US Patent 5,792,936). In the parallel achievements Fromm et al. (1990, *Bio-Technology* 8: 833–839) and Gordon-Kamm et al. (1990, *The Plant Cell* 2: 603–618) applied biolistic method to attain maize gene transfer. Our selected genotypes outstanding in tissue culture have been used to establish an alternative maize breeding system. The review of CRC research accomplishments within co-operation happened to be congratulations, laudation and respect to professor Dénes Dudits for his 70th birthday.

A jelen megnyilvánulás körülményei

Ma a biotechnológia sokszor szól egyoldalúan főleg a géntechnológiai úton módosított (GM, újabban biotech) szervezetekről. Miközben például a GM növények termesztése Európában nem kívánatos, hazánkban egyenesen tilalmas, egyes óriási területű országokban eluralta a termőterületet. Sok felfedezés, rengeteg kutatás előzte meg az egyszerűbb szervezetek bevonásával a GM növények létrejöttét. A köztermesztéssel kapcsolatos mai ellentmondásos helyzetben feledésbe merül az a nagy tudományos vetélkedés, gazdasági verseny, ami elvezetett a folyamatosan nagyarányban vetett terménynövényeinkbe ültetett idegen gének öröklődéséig, GM fajták termesztéséig. Ennek a folyamatnak a célegyenesében zajló kalandos tudománytörténetet írta meg D. Charles (2001) amerikai tudományos újságíró. A könyvből kiderül, hogy a világ egyik legjelentősebb terménynövényének, a kukoricának a világon az egyik első, annak a legnehezebb válfaja tekintetében pedig a legelső öröklődő génmódosítást épp szegedi kutatási eredmények segítették megvalósítani. A témában született részletes szabadalmi leírásunk, valamint a szövettényésztési és géntranszformációs közleményeink taglalják a fő eredményt és egy-egy tudományos részterületet, de ezekből nehéz a világviszonylatban egyedülálló, tényleges hozzájárulásunkat átlátni. Gyakran a hazai szakterületen kutatók sem rendelkezhetnek kellő tájékozottsággal a sok nem közölt részlet, illetve a kutatást támogató, megrendelő vállalatok által igényelt, mára már hatályát veszített üzleti titoktartási kötelek folytán. Annak ellenére, hogy számos nemzetközi hivatkozás kötődik a közleményeinkhez, a világon az egyik első öröklődő kukorica-géntranszformációban játszott szerepünk az összefoglaló munkákban is rendre elsikkad. Ez szintén indokolhatja a jelen visszatekintést és értékelést.

1976-tól kapcsolódhattam be a Gabonakutató (akkor Gabonatermesztési Kutatóintézet) kukoricanevelési tevékenységébe. Az akkori vezető, azóta kutatóprofesszor Németh János erőteljes, befolyásos személyiségével, hallatlan munkabíráásával, nyelvi és szakmai tehetségével és folyamatosan kialakított munkatársi közösségével megteremtette Szegeden a szellemi, a működési hátteret, valamint az akkor legjelentősebb kukoricavonalakhoz való hozzáférést. Németh János munkássága közvetlenül kapcsolódik Papp Endréhez, aki Európában elsőként nemesített hazánkban államilag minősített beltenyésztéses kukoricahibridet. A feleségével Szegeden az első kukorica-szövettényészteteket indító, nemzetközi hírű kutató, Sági Ferenc által vezetett központi laboratóriumban ismerkedhettem meg közelebbről a kukorica-szövettényésztéssel, ami lehetőséget adott az együttműködésre az MTA Szegedi Biológiai Központjában, kezdetben a jeles genetikus, kutató főorvos Raskó István vezetése alatt működő nemzetközi továbbképző tanfolyam (ITC) keretében 1979-ben. Dudits Dénes az örökléstan és nemesítés szakembereinek nemzedékeit oktató, a témában átfogó hazai tankönyveket író Bálint Andor professzor vezette tanszékről indult el Gödöllőről, kutatóként sikeresen megjárta a híres Gamborg, illetve Kao laboratóriumot Kanadában, mielőtt engem is, mint más távolabbi nemesítő intézményekben dolgozó (pl.: Iregszemcse, Sopronhorpács), az újabb kutatások iránt érdeklődő kutatókat, megtalált. Miközben a körülötte épülő tudományos iskola tagja voltam, szemlélhet-

tem vitathatatlan nemzetközi tudományos eredményeit, az akadémiai alelnökségig jutott sikeres pályáját, állhatatos küzdelmét a tudomány és a hazai nemesítési kutatások fejlődéséért. A szövettenyésztési módszerek kukoricánemesítési alkalmazása terén elért eredményeink legközvetlenebb szegedi személyi és intézményi előzményeire, körülményeire igyekeztem szorítkozni.

A Harvard Egyetemen vendégprofesszorként dolgozva 1982-től került kapcsolatba Dudits Dénes a német Höchst AG neves, többirányú tehetségét szerénységgel palástoló kutatójával, Günther Donn-nal, ami együttműködéshez, kutatási megbízásokhoz vezetett. Többéves, a kukoricakutatást is magában foglaló együttműködés után kaptam meghívást a cég növényvédelmi osztályának akkori vezetőjétől, Friedrich Wengenmayertől a Frankfurt am Main-i székhelyű növényvédelmi kutatólaboratóriumukba. A korábbi megbízásos kutatásokból adódó bevételek és a kinti kiváló kutatási lehetőségek nem elhanyagolhatóan járultak hozzá a közös nemzetközi sikerünkhöz a kukorica-géntranszformációban, ami a későbbi szabadalmi oltalom hasznosítása révén jelentős megtérülést hozott a két résztvevő hazai intézmény számára is.

Az évtizedes szelekció eredményeként megadatott kiemelkedő szövettenyésztési tulajdonságaiban a világon páratlan kukoricafajta birtokában a hazai nemesítési alkalmazás szükségyszerűnek tűnt. Egyre világosabbá vált, hogy a géntranszformációs hasznosításhoz elsősorban a nemzetközi méreteket elért vállalatok rendelkeznek megfelelő adottságokkal, ott versenyhátrányban vagyunk. A kukoricavonalak egyik, a szövettenyésztésre alapuló, gyorsított előállításra tekinthető számunkra a legfőbb nemesítési alkalmazási lehetőségnek egyedülálló szövettenyészteteinkkel. Bár ezt kísérleti szinten megoldottuk, a nemesítési méretekből való alkalmazás előtt, figyelembe véve a kukoricánemesítésben zajló óriási versenyt és a fejlesztő-kutató erőfeszítések hasznosulását eddig részleteiben nem közöltük.

A könyvfejezet megírásával nagyrabecsülésemet, tiszteletem szeretném kifejezni a nevezetes születésnapjához érkező kandidátusi témavezetőmnek, példaadó kutatótársamnak.

A kukorica-szövettenyésztés tudományos helyzete az 1970-es évektől

Ez a fejezet terjedelmi okból sem adhat átfogó, teljes körű irodalmi áttekintést, csak a leginkább idevágó irodalmi vonatkozásokat, feltevéseket említi meg.

A kukorica-szövettenyésztés mint módszer jelentősége nagyot nőtt, amikor 1975-ben amerikai, illetve kínai kutatók közölték, hogy éretlen embriók (Green és Phillips 1975) illetve portokokban leoltott kifejetlen pollenek (Anonymus, 401-es kutatócsoport, 1975) szövettenyésztéséből sikeresen állítottak elő termőképes növényeket a Murashige–Skoog (1962) táptalaj változatain. Egyre világosabbá vált, hogy a sikeres szövettenyésztés egyik döntő tényezője a kiindulásul választott fajta (vonal, hibrid stb.) erre alkalmasító tulajdonságegyüttese, amely bizonyos sejtekhez, szervekhez, azok megfelelő fejlettségi állapotához kötődik. A testi sejtekből, leginkább 1-2 mm-es embriókból a teljes növényre fejlődés képességét megőrző, ún. toti-

potens¹ szövettenyészetek, kalluszok létesítésére modellfajtvává vált A188 vonal nem válaszolt a portoktenyésztés során (Brettel et al. 1981; Genovesi és Collins 1982), ezért ez utóbbi célra kezdetben a kínai genotípusok szolgáltak. A század 80-as éveiben általános volt az a nézet, hogy az egyszikűek nem megfelelőek az agrobaktériumos géntranszformációra, ezért ott a csupasz DNS formában történő idegen génbevitel a megoldás. Ezt pedig a DNS bejutását akadályozó növényi sejtfal eltávolítása után lehet megoldani a különvált, csak sejthártyával határolt sejtekbe, az ún. protoplasztokba² villamosáram-lökésekkel (elektroporáció) vagy PEG-adagolás,³ -kezelés segítségével (Fromm et al. 1986; Rhodes et al. 1988b; Planckaert és Walbot 1989; Lyznik et al. 1989a és 1989b). Ezért folytak kiterjedt kísérletek a sikeres kukorica-protoplasztálás és -tenyésztés érdekében. Előbb megkérdőjelezték, de később kiderült, hogy a kukoricát is meg lehet változtatni örökletesen, a természetből ellesett módon a megfelelő törzsek, vektorok és körülmények esetén agrobaktériummal (Slogteren et al. 1984; Graves és Goldman 1986; Ishida et al. 1996). Később parányi részecskékre (µm-tartomány) felhordott DNS belövésével az ellenálló növényi sejtfalon át is sikerült bejuttatni a genetikai információt rejtjelező külső molekulaláncot az egyszikűek sejtjeibe, ahol azok bizonyos gyakorisággal öröklődő módon beépülnek az adott génállományba (Klein et al. 1988 és 1989).

A kukorica szövettenyésztés megalapozása Szegeden

Kísérleteinkben a legelterjedtebben használt (MS, B5, SH: Murashige és Skoog 1962; Gamborg et al. 1968, illetve Schenk és Hildebrand 1972) vagy a kifejezetten egyszikű portoktenyésztésre kifejlesztett (N₆: Chu et al. 1975; a továbbiakban N6) táptalajok, egységesített répacukor és 2,4-D-tartalom mellett csak egyes, elvétve előforduló vonalak esetében eredményeztek olyan kalluszt, szövettenyészetet, amelyekből növények sarjadtak a 2,4-D megvonása után. Ezek is változó számú, de általában 2-3 áttolás után megszűntek növénydifferenciálódást mutatni az ezt biztosító tápközegeken. A Duncan és munkatársai (1985) által módosított N6 (N6D) tápközeg, amelyen a közlemény szerint sok, a szövettenyésztésnek ellenszegülő kukoricavonal bizonyult totipotensnek, kísérleteinkben nem váltotta be a hozzá fűzött reményeinket. Ahogy Wilkinson és Thomson (1987) 37 elit vonallal végzett háromlépcsős kísérletében (indítás, embrioidérlelés, növényregeneráció), a mi tapasztalatunk szerint is az N6D táptalajon esetenként gyorsabban nőttek a sejtenyészetek, mint az alkalmazott egyéb tápközegeinken, de a legértékesebb beltenyésztett vonalaink hosszabb ideig való szö-

¹ A teljes növényvé váló fejlődési képesség megőrzésére utaló tulajdonság.

² Általában sejtfalbontó enzimek segítségével lecsupaszított, csak sejthártyával határolt, különvált növényi (itt kukorica-) sejt.

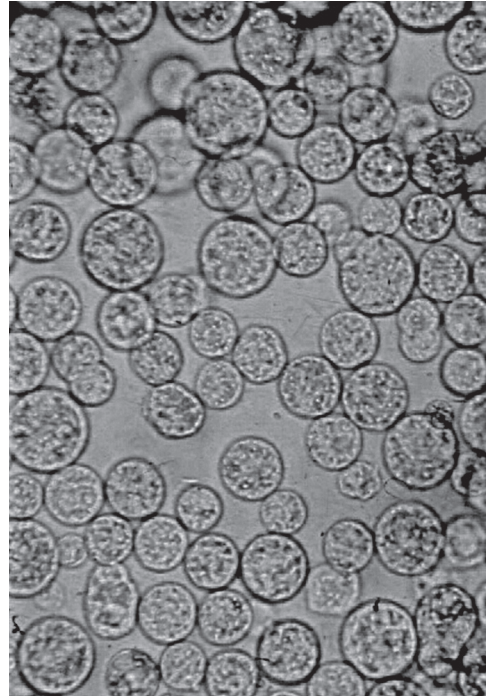
³ PEG: polietilén-glikol; az alpmolekulából változó mértékben polimerizált, ennek megfelelően az átlagszámokkal jelölt (pl. PEG 6000) vegyület, amely leggyakrabban a protoplasztok egybeolvasztására vagy a DNS sejtekbe juttatására használatos a növényi sejtenyészetekben.

vettenyésztés után (0,5–1 év) elveszítették a totipotenciájukat (Kegyes, Kálmán és Mórocz 1990, nem közölt). Az N6D közegről származó növények termékenyülése elmaradt az általunk módosított N6 táptalajon (N6M; Mórocz et al. 1990) sarjadt növényekéhez képest.

A tenyésztési körülményekhez viszonyítva jelentősebb előrehaladást tudtunk elérni azoknak a kukoricavonalaknak az összekeresztezésével, amelyek az alkalmazott táptalajokon mutattak valamilyen kedvező szövettenyésztési tulajdonságot. Az első sikeres hibridgenotípusunk az A188 x W64A kétvonalas hibrid volt, amelynek éretlen embrió eredetű kalluszai több mint másfél évi szövettenyésztésben tartás után is termőképes növények fejlődését tették lehetővé (Mórocz et al. 1982). Később 4 és 8 vonalas hibridekből, illetve még összetettebb növényállományokból (szintetikus fajtákból), amelyek kukoricavonalakon kívül genetikai törzseket (pl. Black Mexican Sweet); tájfajtákat is tartalmaztak, éretlen embriókat felhasználva válogattunk ki egyedeket az örökletesen hasadó állományból a kiváló tenyésztésindulás, a gyorsabb kallusznövekedés, a jó növényesarjadás és a termékeny növények differenciálási képességének a szövettenyésztés során való hosszú távú (2 éven túli) megőrződése alapján. Egyik ilyen négyvonalas hibridből szelektált genotípusunk, a 4C1 kiemelkedő szövettenyészthetőségét független kutatók is megerősítették (Emons és Kieft 1991; Pretova et al. 1993). Mivel több kísérletből is kiderült, hogy a testi sejtekből, illetve az ivarsejtekből megnyilvánuló jó szövettenyésztési sajátságok nem feltétlenül kapcsolódtak, külön szelekciós ágon építettük egybe a kukoricaportokok leoltása során válaszoló kiindulási anyagokat sorozatos keresztezésekkel. Egy ilyen összetett állományból (MRS P/85: a szerző intézményi monogramjához [MR] társuló szintetikus fajta, amely portoktenyésztés céljára 1985-ben állt össze) 1986-ban nyertük a H229 elnevezésű, portokkultúrából származó *haploid*⁴ eredetű tenyésztünket, amelyik több vonatkozásban is kiemelkedőnek bizonyult. Jellemzője, hogy örökletesen spon-tán fejlődött morzsálódó (omlós, porhanyós, laza; angolul *friable*) típusú embrió-szerű szövettenyészetet (korábbi tenyésztési embriófejlesztő: KoE [korai embriogén]), amely így nagy mennyiségekben szaporítható (1. ábra). Könnyedén, 1-2 átoltás után csupasz egyes sejtek (protoplasztok) leválasztására alkalmas félfinom folyadéktenyészetté (szuszpenzióvá) alakítható, nagyszámú növény volt nevelhető a tenyésztésből, ezt a képességét igen hosszú ideig megtartotta (15 év után is), és protoplaszt szint-ről is termékeny növényekig tudott fejlődni, igaz, hogy Shillitoékhoz (1989) hasonlóan csak keresztezéssel sikerült róla szemtermést kapni. Ilyen típusú, a szövette-nyésztésre legalkalmasabb kukorica-szövettenyészetet korábban sokféle körülmény biztosításával (pl. prolin adásával, gyakori átoltással, fénysegény körülmények kö-zött) tudtak megvalósítani olyan genotípusokból, amelyek az összeálló, alaktanilag összetett, a kifejlett embriókra emlékeztető (angolul: *compact*; javaslatunkban: *késői embriogén*: KéE) alaptenyészetet fejlesztettek, és az így kiváltott korábbi embriófej-lettséghez köthető tenyésztési állapotot csak a különleges beavatkozások időtartama

⁴ Az ivarsejtekre jellemző, a testi sejtekhez képest fél kromoszómaszerelvény vagy az ezzel rendel-kező (kukoricánál 10 kromoszómás) sejt-, illetve növényegved.

alatt tartották meg. Belőlük általános-
ságban egyes sejtek szintjéről vagy nem
tudtak termőképes kukoricánövényeket
felnevelni (Rhodes et al. 1988), vagy a
génbeviteli eljárás után állt elő a terméke-
nyülésképtelenség (Rhodes et al. 1988a).
Később (1988-ban) egy másik szövetten-
nyésztési célra létrehozott összetett fajta
éretlen embrióinak szövettenyésztéséből
történő kiválogatással is sikerült fellelni
egy KoE típusú tenyészetet, ami az OK281
elnevezést kapta. A H229 x OK281 hibrid
embriókból a szülőknél is jobban működő
korábbi embriószerű tenyészeteket sike-
rült indítani 1989-ben (1–4. ábra). Ebből
a tenyészetből nemcsak a protoplasztá-
lás, de az azt követő csupasz DNS-bevitel
után is, még ötévi fenntartást követően is
termőképes növényeket tudtunk nyerni.
Ebben a vonatkozásban ez egyedülálló
a világon. Bár a sikeres, termékeny nö-
vényekig eljutó (totipotens) kukorica-
protoplaszt-rendszerben két közlemény is
előbb jelent meg (Prioli és Söndahl 1989;
Shillito et al. 1989), az egyes sejtszinten
elvégzett öröklődő idegengén-beépülést
eredményező kukoricagénállomány-átala-
kítást mi tudtuk megvalósítani elsőként a
világon (Szabadalmi közlemények 1990,
1995). Ebben a jelentős eredményben a
legnagyobb jelentőségű előrehaladást a kiemelkedő szövettenyésző tulajdonságokkal
rendelkező fajták, genotípusok kb. egy évtizeden át folytatott nemesítése jelentette.
Ezzel párhuzamosan azonban számos, a szövettenyészetek fenntartását, a tenyész-
tési szakaszok időzítését, valamint a protoplasztok különválasztásának oldatait, fo-
lyamatait érintő változtatást dolgoztunk ki a soklépcsős eljárásban (Mórocz et al.
1990; Mórocz 1993). Ez a kutató tevékenység három színhely együttműködésével
zajlott (Höchst AG, Frankfurt a. M., Németország, MTA SzBK, Gabonatermesztési
Kutatóintézet [jelenleg Gabonakutató Kft.], Szeged).



3. ábra. Megfelelően ütemezett
kukorica-sejtszuspenziókból a további
kísérletekhez megfelelően tiszta
protoplasztállomány hozható létre módosított
eljárásunk révén. Szabadalmi oltalmat kapott
rendszerünkben ennél az állapotnál juttatjuk
be a sejtekbe a génállományt módosító csupasz
DNS-szakaszt

A mesterséges kukorica sejt-növény rendszer és hasznosítása génmódosításban

A HE/89 sejt-növény rendszer a kidolgozott eljárással kisebb-nagyobb módosítás után is sikeresen működött a már említett három független laboratóriumban. Günter Donn a világon a leghatékonyabb kukorica-géntranszformációs rendszert ennek a genotípusnak és a kidolgozott sejtenyésztési módszer több elemének alkalmazásával alakította ki (Donn et al. 1990; EP/23.06.90/ EP 90111946; United States Patent 5,792,936; illetve Donn et al., nem közölt eredmények). Ezt a sejtvonalat, a protoplasztrendszer és a hozzá kötődő csupasz DNS-beviteli eljárást a Höchst AG, illetve az ebben a fejlesztésben együttműködő, támogató ágazatának későbbi vállalatai (AgrEvo, Aventis, Bayer CropScience) a világ fejlett kukoricatermesztő országaiban szabadalmi oltalomban részesítették. A LibertyLink® jelölésű hibridek az itt kivonatolva leírt sejt-növény rendszerünket alkalmazó Günter Donn hatékony géntranszformációs tevékenysége nyomán jöhettek létre. Ezt a beépülést, amely az Egyesült Államokban Liberty néven forgalmazott (Erópában Basta®, Finale® néven is ismert), a zöld növényeket hervasztó, gyomtalanító szerrel szemben a kukoricának védelmet nyújt, egyéb géntranszformációkból származó beépülési eseményekkel együttesen alkalmazzák a kukoricahibridekben (pl. a Genuity™ vagy a SmartStax™ – ez utóbbi nyolc különböző génmódosítás együtt). Ezek vetésterülete az Egyesült Államokban és más GM kukoricát termesztő országokban egyre növekszik, összevéve jelenleg több tízmillió hektárt tesz ki (James 2012).

Dudits professzor irányításával az MTA SzBK a kutatásokat mindvégig támogató Alföldi Lajos professzor, főigazgató által vezetett Genetikai Intézetében, később a Növénybiológiai Intézetében elsősorban tudományos kísérleti célú kukorica-géntranszformáció zajlott a szabadalmi oltalommal rendelkező rendszer tudományos hasznosítására. Ennek eredményeként közlemények születtek (Omirulleh et al. 1991 és 1993; Golovkin et al. 1993), illetve megbízást teljesítettünk a világ egyik vezető európai központú kukoricanevelő vállalkozásának az általuk fejlesztett DNS-konstrukciók kukoricába ültetésével.

A Gabonakutatóban az agrobaktériumos transzformációt előbb protoplaszt szinten alkalmazva jutottunk üvegházi növényekig (Oláh et al. 1997, nem közölt), majd a KoE típusú szövettenyészeteken sikerült az agrobaktérium közvetítésével örökldően beépíteni az SzBK-ban izolált (Endrei et al. 2000), a lucerna N-kötésében szerepet játszó NORK gént (Kis 2001–2004; Bárkai et al. 2004, nem közölt).

Időközben elsősorban a géntechnológiával kapcsolatos európai visszafogottság miatt a speciális fajtát és felkészültséget igénylő sejtszintű géntranszformáció fokozatosan háttérbe szorult az egyszerűbben kivitelezhető génbevitel, illetve a teret nyelő agrobaktériumos eljárás következtében.

Elsősorban Dudits Dénesnek a hazai mezőgazdasági kutatás előrehaladása iránti elkötelezettségének tudható be, hogy világviszonylatban is az elsők között jöhetett létre itthon szántóföldi kísérlet több jelentős terménynövényünkkel (kukorica, burgonya, repce, lucerna, dohány – 5. ábra). Így a kukoricával is megfelelő óvintézkedé-

sek mellett (pl. időbeli és térbeli izoláció, termésmegsemmisítés) 1993–94-ben elvégezhattük az első hazai, a pollennel való továbbterjedés kockázatát becsülő szántóföldi kísérletet (Móroczt et al., 2000). Mint a többi növénynél, a kukorica esetében is a Szegedi Biológiai Központ meghatározó szerepű volt a kezdeti következményfelmérő kísérletekhez szükséges transzgénes növények létrejöttében.

Kukorica-szövettenyésztési rendszereink egyéb alkalmazása

Miközben a géntechnológia kutatása egyre szélesebb körű, a gyakorlati nemesítési alkalmazás inkább az ennek a pénzügyi terheit viselni képes és a használatából nyereséget elérő világvállalatoknak kedvez. Nyilvánvalóvá vált, hogy számunkra egyéb megközelítést, hasznosítást célszerű találni.

Egyik ilyen irányként foglalkoztunk a kukorica és búza testi sejtek egybeolvasztásával, aminek mind elméleti, mind gyakorlati szempontból lehet jelentősége. Erre egy olyan mikrospóra⁵ eredetű kukorica-sejtvonalunk adott lehetőséget, amelyből növényekig juthattunk protoplasztuszintról, és amelyik egyúttal fehérlevelű (albínó) növényeket adott, és semmiféle zöldülést nem tapasztaltunk a tenyészetben vagy a belőle sarjadt növényeken. A búzalevelekből emésztéssel leválasztott és megtisztított protoplasztok a tenyésztési körülményeink között nem voltak képesek osztódó sejtekké válni. Ezért a kétféle protoplaszt fúziója után nyert zöld növényekről joggal feltételeztük, hogy azokban a két génállomány egymásra hatása eredményeként nyilvánult meg az osztódóképesség és a zöldülés együttesen. Sajnos szemtermést a felnevelt kukorica kinézetű növényeken sem anyai, sem apai szülőként nem tudtunk elérni. A zöldülésen kívül észlelt citológiai és DNS-molekulás (RAPD) vizsgálatok is a két faj bizonyos génállomány-egyesülésére utaltak (Szarka et al., 2002).

A másik alkalmazási területe azoknak a kukorica-genotípusoknak, amelyek a hozszadalmas nemesítési tevékenység eredményeként képesek szövettenyésztési körülmények között akár kifejtetlen virágporszemekből is növényre fejlődni, a hagyományosan időigényes, többnemzedékes öntermékenyítést igénylő vonal-előállítási időszaknak a jelentős rövidítése. Ennek a kukoricánemesítési célra való hatékony alkalmazásához a kiválóan szövettenyésztő kiindulási anyagainkat részben fel kellett ruházni azokkal a tulajdonságokkal, amiket a mai, államilag elismert hibridekben elvárunk, másfelől meg kellett teremteni azt a rokonsági szétválasztást az újonnan nyert vonalakban, ami a heterózishatás⁶ eléréséhez szükséges a kukoricavonalakból előállított hibridekben. Ezt az éretlen pollenszemek szövettenyésztését magában foglaló kukoricánemesítési rendszert lényegében sikerült kiépíteni (6–10. ábra). Párhuzamot vonhatunk az eddig még részleteiben nem közölt, itt leírt nemesítési rendszer, va-

⁵ Itt még nem teljesen érett, kifejtetlen (kukorica) virágporszemet jelent.

⁶ Az eltérő rokonságú szülők keresztbeporzása után előállt egyedekben megnyilvánuló utódfölény; legkifejezettebben a kimunkáltan örökletesen eltérített kukoricavonalak közötti hibridizáció során tapasztalható.

lamint az Egyesült Államok egyik legsikeresebb nemesítő cége két fő vonalkörének (BSSS és Iodent) nemesítéstörténete között. Smith és munkatársai (2004) megállapítják, hogy az említett cégnél a vonalak mindkét, egymással jól kombinálódó csoportja zömmel egy azonos, a Reid Yellow Dent fajtából ered, és fokozatosan távolították el a két nagy arányban azonos forrásból származó csoport rokonságát a megfelelő hibridhatáshoz szükséges mértékben.

A portokokban leoltott éretlen pollenekből nyert vonalak egy háromvonalas hibridjéből sikerült a még ki nem fejlett kukorica-virágporaszemek közvetlen tenyésztésével is vonalakat előállítanunk (Szarka et al. 2001). Ennek előnye abban mutatkozik meg, hogy a munkaigényes portok-elkülönítést a virágokból felválthatjuk egy hatékony aprításos megoldással (pl. elektromos forgókésekkel), ami után szűréssel, megfelelő sűrűségi oldatlépcsőkön történő elválasztással akár egy teljes címerből kinyerhetjük a mikrosporákat, illetve azok tenyésztési célra legmegfelelőbb halmazát. A kecsegtető lehetőség kihasználását azonban akadályozza a kiszabadított, még fejlődésben lévő hímvarsejtek csekély mértékű tenyészthetősége. Ezen a területen a jövőben, véleményem szerint, jelentős fejlődés várható.

Kukorica-szövettenyésztési fejlesztéseink kívánatos jövőbeli szerepe

Ahogy a 30-40 évvel ezelőtti növénytermesztési tankönyvekből is tanultuk, a kukorica ma is kb. egynegyedét foglalja el a hazai vetésterületnek. Ezen az egymillió hektárt meghaladó területen teljesen háttérbe szorultak a magyar nemesítésű hibridek, így tízmilliárdos vetőmagpiaci nyereség élvezetétől esünk el. Ma már tudjuk, hogy nem a világméretű hibridkísérletekben, hanem a bőtermő vonalak nemesítésében rejlik a sikeres kukoricahibridek előállításának kulcsa (Troyer és Wellin 2009). A kukoricavonalakat eddig döntően a kiindulási anyagból kiválasztott egyedek annyi egymást követő nemzedékének öntermékenyítésével állították elő, amennyi a beltenyésztéses minimum, a gyakorlati egyöntetűség eléréséhez szükséges. Ez változó számú, általában 6-8 nemzedéket igényelhet (Röber et al. 2005). Ennek a rövidítésére egyre elterjedtebben használatos a Chase-féle monoploid⁷ módszer napjainkra igen hatékonyná vált továbbfejlesztett változata. A legjobb, anyai monoploidokat kiváltó beporzó vonalakkal átlagosan 8,1 (Röber et al. 2005) vagy 10% feletti (Rotarenco et al. 2010, nem közölt, Maize Genetics Cooperation Newsletter, 84) azoknak a megtermékenyült és a színkifejező gének segítségével kiválasztható szemeknek az aránya, amelyekből a fél kromoszómaállomány kettőzésével közvetlenül vonalak nyerhetők, megtakarítva a többnemzedékes öntermékenyítés idő- és munkaigényét. A monoploidokkal folytatott szelekció nemcsak időnyerő, hanem nagyon hatékony is a szelekciós előrehaladást tekintve (Rotarenco et al. 2012; Geiger és Gordillo 2009; Smith et al. 2008).

⁷ Megegyezik a haploiddal, de tudománytörténeti és megkülönböztetési okból ez a kifejezés a természetesen, beporzás után előállt fél kromoszómaállományú egyedekre vonatkozik itt, míg a haploid kifejezés a szövettenyésztés során létrejött kromoszómaszám-csökkentett egyedeket jelöli.

Ez a kukoricánemesítésbe könnyen beilleszthető eljárás is több figyelmet érdemelne a hazai nemesítési programokban. Az általunk kifejlesztett rendszer, amelyik nemcsak az időközben szemléletváltó kukoricánemesítési ismereteket, hanem szövettényészeti szakértelmet és felkészültséget is igényel, a figyelemre méltó monoploid módszerhez képest is több előnnyel rendelkezik a várható eredményességét illetően. Erre példát azok a martonvásári kísérletek szolgáltatnak, amelyek az *in vitro*⁸ szelekció vonatkozásában világviszonylatban is úttörők (Ambrus et al. 2006; Spitkó et al. 2006; Darkó et al. 2011). Megítélésem szerint a kiemelkedő agronómiai és szövettényészeti tulajdonságokkal egyaránt rendelkező genotípusainkra épülő kukoricánemesítési rendszerünk éppolyan egyedi, mint az az egyedülálló sejt-növény rendszerünk, amit felhasználtunk a kifejlesztéséhez. Ezért ígéretes lehetőséget hordoz a hazai kukoricánemesítés sikeresebbé tétele szempontjából.

Köszönetnyilvánítás

Mid van, amit nem kaptál? (1Kor. 4,7). Mind a kukorica-virágpor eredetű H229, mind az utódnemzedékében az éretlen csírából származó HE/89 szövettényészeti bár hosszú szelekciós és módszertani munka eredményei, a nem nyilvánvaló, korábban ismeretlen hormonönellátó jellegüknek köszönhetik egyedülálló (Armstrong 1999) szövettényészeti alkalmasságukat. Ez tette lehetővé a ráépülő géntranszformációs rendszer szabadalmazását az Egyesült Államokban. A már említett szakmai elődeimen, alkotótársaimon kívül, akik közül főmunkahelyemen külön tisztelettel adózom Németh Jánosnak, a fenti témában hosszabb-rövidebb ideig közvetlen kutatótársam volt Oláh Mária, Kegyes Gabriella, Szarka Béla, Göntér Ildikó, Horti Tibor és Bárkai Tünde. Czollner Tünde agrármérnök kiemelkedő kutatóasszisztensi ténykedése pár évre korlátozódott. A leghosszabb ideig Lajtósné Vincze Rozália segédkezett elhivatott laborasszisztensként. Bomba Lajosné, Gajdács Klára, Lajtár Tímea, Csatlós Mária laboránsként, Kiss Zoltánné technikusként, Czene Ilona, Bacsó Tiborné, Hajdú Réka laborkisegítőként dolgozott általában több évet a közvetlen szövettényészeti, nemesítési csoportban. Intézményünk vezetői, a kukoricánemesítési és más részlegek, különösen a műszaki osztály munkatársai, akiket nem sorolok fel, szintén hozzájárultak a fent tömören leírt sikeres tevékenységhez. A szövettényészeti hazai úttörő professzorai, Maróti Mihály és Heszky László igen lényeges alapismereteket, illetve segítséget nyújtottak. Az Egyesült Államok egyetemének közszolgálati elkötelezettsége, amely révén rendelkezésünkre bocsátották a szelekcióhoz kiindulásul szolgáló kukorica-genotípusokat, nélkülözhetetlen hozzájárulást jelentett. A társintézmény (MTA SzBK) munkatársai, kollégái által megteremtett befogadó, ösztönző légkör, módszertani segítség meghatározó jelentőségű volt kutatómunkánkban, amiben Dudits Dénes szerepe kiemelkedő. Hasonlóan meghatározó volt a tudásunkat, felkészültségünket

⁸ Mesterséges, a környező élővilágtól elzárt körülmény (pl. Petri-csésze, lombik, műanyag csó stb.); itt leginkább szövettényészeti feltételeket jelent.

elismerő, és a kutatómunkánkat pénzzel, jogi háttérrel és emberileg segítő Höchst AG, különösen is Günter Donn szerepe a tudományos és a jelentős gazdasági siker elérésében. Szüleim, tanárain, feleségem, más családtagok, barátok és társak sokrétű támogatása számomra ugyanannak az ingyen kegyelemnek a részét képezik, amelynek révén a páratlan kukoricaegyedekre is szert tehettem. Köszönöm a szerkesztőknek a megtisztelő felvételt a fejezetírók sorába.

Felhasznált irodalom

- Ambrus, H.–Darko, E.–Szabo, L.–Bakos, F.–Király, Z.–Barnabas, B. (2006) In vitro microspore selection in maize anther culture with oxidative-stress stimulators. *Protoplasma* 228: 87.
- Anonymus, 401-es kutatócsoport (1975) Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays*. *Acta Genetica Sinica* 2: 138–143.
- Armstrong, C. L. (1999) The first decade of maize transformation: A review and future perspective. *Maydica* 44: 101–109.
- Brettel, R. I. S.–Thomas, E.–Wernicke, W. (1981) Production of haploid maize plants by anther culture. *Maydica* 26: 101–111.
- Chu, C. C.–Wang, C. C.–Sun, C. S.–Hsü, C.–Yin, K. C.–Chu, C. Y.–Bi, F. Y. (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659–668.
- Daniel, C. (2001) *Lords of the Harvest. Biotech, Big Money, and the Future of Food*. Perseus Publishing, Cambridge.
- Darko, E.–Fodor, J.–Dulai, S.–Ambrus, H.–Szenzenstein, A.–Király, Z.–Barnabas, B. (2011) Improved Cold and Drought Tolerance of Doubled Haploid Maize Plants Selected for Resistance to Prooxidant *tert*-Butyl Hydroperoxide. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 454–465.
- Donn, G.–Nilges, M.–Mórocz, S. (1990) Stable transformation of maize with a chimaeric, modified Phosphinithricin-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes*. In: Abstracts VII. International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Amsterdam, June 24–29, 1990. 53.
- Duncan, D. R.–Williams, M. E.–Zehr, B. E.–Widholm, J. M. (1985) The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous *Zea mays* genotypes. *Planta* 165: 322–332.
- Emons, A. M. C.–Kieft, H. (1991) Histological comparison of single somatic embryos of maize from suspension culture with somatic embryos attached to callus cells. *Plant Cell Reports* 10: 485–488.
- Endre, G.–Kereszt, A.–Kevei, Z.–Mihacea, S.–Kalo, P.–Kiss, G. B. (2002) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962–966.
- EP/23.06.90/, E. P. 90111945: Improved *Zea mays* (L.) genotypes with capability of long term, highly efficient plant regeneration.

- EP/23.06.90/, E. P. 90111946: Fertile transgene Maispflanzen mit artfremden Gen sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.
- Fromm, M. E.–Taylor, L. P.–Walbot, W. (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791–793.
- Gamborg, O. L.–Miller, R. A.–Ojima K. (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybeans root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151–158.
- Geiger, H. H.–Gordillo, G. A. (2009) Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica* 54: 485–499.
- Genovesi, A. D.–Collins, G. B. (1982) In vitro production of haploid plants of corn via anther culture. *Crop Science* 22: 1137–1144.
- Golovkin, M. V.–Ábrahám, M.–Mórocz, S.–Botka, S.–Fehér, A.–Dudits, D. (1993) Production of transgenic maize plants by direct DNA uptake into embryogenic protoplasts. *Plant Science* 90: 41–52.
- Gordon-Kamm, W. J.–Spencer, T. M.–Mangano, M. L.–Adams, T. R.–Daines, R. J.–Start, W. G.–O'Brien, J. V.–Chambers, S. A.–Adams, W. R.–Willets, J. N. G.–Rice, T. B.–Mackey, C. J.–Krueger, R. W.–Kausch, A. P.–Lemaux, P. G. (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell* 2: 603–618.
- Graves, A. C. F.–Goldman, S. L. (1986) The transformation of *Zea mays* seedlings with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol. Biol.* 7: 43–50.
- Green, C. E.–Phillips, R. L. (1975) Plant regeneration from tissue cultures of maize. *Crop Science* 15: 417–421.
- Hooykaas-van Slogteren, G. M. S.–Hooykaas, P. J. J.–Schilperoort, R. A. (1984) Expression of Ti plasmid genes in monokotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 311: 763–764.
- Ishida, Y.–Saito, H.–Ohta, S.–Hiei, Y.–Komari, T.–Kumashiro, T. (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* 14: 745–750.
- James, C. (2012) *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2012*. ISAAA Brief No. 44. ISAAA, Ithaca.
- Kiss György Botond témavezető (2001–2004) Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Programok (NKFP Pályázat) Lucerna konzorcium. Kutatási jelentések.
- Klein, T. M.–Fromm, M.–Weissinger, A.–Tomes, D.–Schaaf, S.–Sletten, M.–Sanford, J. C. (1988) Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 4305–4309.
- Klein, T. M.–Kornstein, L.–Sanford, J. C.–Fromm, M. E. (1989) Genetic transformation of maize by particle bombardment. *Plant Physiol* 91: 440–444.
- Lyznik, L. A.–Kamo, K. K.–Grimes, H. D.–Ryan, R.–Chang, K. L.–Hodges, T. K. (1989) Stable transformation of maize: the impact of feeder cells on protoplas growth and transformation efficiency. *Plant Cell Reports* 8: 292–295.
- Lyznik, L. A.–Ryan, R.–Ritchie, S. W.–Hodges, T. K. (1989a) Stable co-transformation of maize protoplasts with *gusA* and *neo* genes. *Plant Mol. Biol.* 13: 151–161.

- Mórocz S.–Németh J.–Dudits D. (1982) Növényregenerálás kukorica szövettenyészetekből. A növényi szövettenyésztés és a gyakorlat. Szimpozium. 1981. május 12–13. Agrártudományi közlemények 41.
- Mórocz, S.–Donn, G.–Németh, J.–Dudits, D. (1990) An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor Appl Genet* 80: 721–726.
- Mórocz S. (1993) Szövettenyésztési rendszerek létesítése és géntranszformált növények előállítása kukoricán. Kandidátusi tézisek, MTA Könyvtár.
- Mórocz, S.–Omirulleh, S.–Donn, G.–Szarka, B.–Ladányi, M.–Albrecht, L.–Dudits, D. (2000) Field experiments with transgenic maize in Hungary in 1993–94. In: Hrazdina, G. (ed.) *Use of agriculturally important genes in biotechnology. 2000 IOS Press Ohmsha NATO Science Series, Series A: Life Sciences*. Vol. 319. IOS Press Ohmsha, Amsterdam, 98–102.
- Murashige, T.–Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with *Tobacco* tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.
- Omirulleh, S.–Stefanov, I.–Ábrahám, M.–Fehér, A.–Mórocz, S.–Golovkin, M.–Karabaev, M.–Dudits, D. (1991) Improved maize transformation system based on morphogenic protoplasts. Abstracts of 8th Int. Protoplast Symp. June 20–26 1991 Uppsala, Sweden. *Physiologia Plantarum* 82(1): A31.
- Omirulleh, S.–Ábrahám, M.–Golovkin, M.–Stefanov, I.–Karabev, M.–Mustárdi, L.–Mórocz, S.–Dudits, D. (1993) Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol Biol* 21: 415–428.
- Planckaert, F.–Walbot, W. (1989) Transient gene expression after electroporation of protoplasts derived from embryogenic maize callus. *Plant Cell Reports* 8: 144–147.
- Pretova, A.–Deruijter, N.–Vanlammeren, A.–Schel, J. (1993) Structural observations during androgenic microspore culture of the 4C1 genotype of *Zea mays* L. *Euphytica* 65: 61–69.
- Prioli, L. M.–Söndahl, M. R. (1989) Plant regeneration and recovery of fertile plants from protoplasts of maize (*Zea mays* L.). *Bio/Technology* 7: 589–594.
- Rhodes, C. A.–Lowe, K. S.–Ruby, K. L. (1988a) Plant regeneration from protoplasts isolated from embryogenic maize cell cultures. *Bio/Technology* 6: 56–60.
- Rhodes, C. A.–Pierce, D. A.–Mettler, I. J.–Mascarenhas, D.–Detmer, J. (1988b) Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 240: 204–207.
- Rotarenco, V.–Dicu, G.–Mihailov, M.–State, D. (2012) Selection and breeding experiments at the haploid level in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Breeding and Crop Science* 4: 72–79 (online: <http://www.academicjournals.org/JPBCS>).
- Schenk, R. U.–Hildebrand, A. C. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 50: 199–204.
- Shillito, R. D.–Carswell, G. K.–Johnson, C. M.–DiMaio, J. J.–Harms, C. T. (1989) Regeneration of fertile plants from protoplasts of elite inbred maize. *Bio/Technology* 7: 581–587.
- Smith, J. S. C.–Duvick, D. N.–Smith, O. S.–Cooper, M.–Feng, L. (2004) Changes in Pedigree Backgrounds of Pioneer Brand Maize Hybrids Widely Grown from 1930 to 1999. *Crop Science* 44: 1935–1946.

- Smith, J. S. C.–Hussain, T.–Jones, E. S.–Graham, G.–Podlich, D.–Wall, S.–Williams, M. (2008) Use of doubled haploids in maize breeding: implications for intellectual property protection and genetic diversity in hybrid crops. *Molecular Breeding New Strategies in Plant Improvement* doi: 10.1007/s11032-007-9155-1.
- Spitko, T.–Sagi, L.–Pinter, J.–Marton, L. C.–Barnabas, B. (2006) Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica* 51: 537–542.
- Szarka, B.–Devenyi, M.–Mórocz, S. (2001) Fertile maize lines obtained from isolated microspores. *Euphytica* 22: 53–60.
- Szarka, B.–Göntér, I.– Molnár-Láng, M.–Mórocz, S.–Dudits, D. (2002) Mixing of maize and wheat genomic DNA by somatic hybridization in regenerated sterile maize plants. *Theor Appl Genet* 105: 1–7.
- Troyer, A. F.–Wellin, E. J. (2009) Heterosis Decreasing in Hybrids: Yield Test Inbreds. *Crop Science* 49: 1969–1976.
- United States Patent 5,792,936 Dudits, Denes (Szeged, HU); Morocz, Sandor (Szeged, HU); Nemeth, Janos (Szeged, HU); Donn, Gunter (Hofheim am Taunus, DE) *Zea mays* (L.) with capability of long term, highly efficient plant regeneration including fertile transgenic maize plants having a heterologous gene, and their preparation. June 5, 1995/ August 11, 1998 Hoechst Aktiengesellschaft (Frankfurt, DE).

IX. Honnan hová tart a zöld agrár-biotechnológia Magyarországon?⁹

DUDITS DÉNES

Összefoglalás

1917-ben Ereky Károly elsőként fogalmazta meg a biotechnológia definícióját. Azóta ugyan megszakításokkal, de folyamatosan fejlődött a magyar, növényekkel dolgozó zöld agrár-biotechnológia. Sikeres területe a mikroszaporítás, amely elsősorban a virágokkal és a gyümölcsfákkal foglalkozó cégek megalapítását tette lehetővé. A növényi sejtek totipotenciáját igazoló szomatikus embriogenezis számos érdekes fejlődésbiológiai kérdést vet fel, ezek tisztázása érdekében került előtérbe a sejtek osztódását szabályzó molekuláris folyamatok kutatása. A búza és a kukorica portoktenyészetekben előállított homoizógóta, dihaploid növények fontos szereplői mind a martonvásári, mind a szegedi nemesítési programoknak. A DNS-szekvencia alapú molekuláris markerek használata segíti a nemesítés mindennapi gyakorlatát, a burgonya-, búza-, kukorica-, szőlő- és paprikafajták előállításában. Magyarországon a növényi génsebészeti munkák a 1980-as évek elején kezdődtek, az első transzgenikus (GM) növényt 1986-ban közölték. A hazai géntechnológiával történő nemesítés lehetőségeit az Alaptörvény jelenleg ellehetetleníti. Ez gátolja a kutatásokat, és megerősíti azt a korábbi tényt, hogy ezen a területen a hazai szellemi termékek hasznosulásához gyakran nemzetközi partner szükséges.

Summary

In 1917 Károly Ereky has introduced the definition of biotechnology. From that time on we can witness the continuous development of green agrobiotechnology in Hungary with some restrictive periods. Micropropagation represents a success field primarily through the foundation of companies for propagation of flowers and fruit trees. Somatic embryogenesis raises several interesting questions for development biology, among those what are the key regulators of cell division cycle in plants. Production of homozygote, dihaploid plant and in vitro cultures of wheat and maize became a key component of the breeding programs in Martonvásár and Szeged. The use of DNA sequence-based molecular markers supports the every day practice of breeding potato, wheat, maize, grape and pepper. The gene engineering research in Hungary started in the early eighties and the first transgenic (GM) plant was published in 1986 from a Hungarian laboratory. Presently the Fundamental Law of Hungary restricts the potentials of gene technology-based breeding. It also prohibits basic science and strengthens the previous experience that the commercialization of novelties from Hungarian biotechnology research highly depends on the collaboration with international partners.

⁹ A szerző köszönetet mond Godó Klárának a fejezet lektorálásáért.

Zöld biotechnológia, a tudományterületek és technológiák integrátora

A biotechnológia szó említésekor az ember egyrészt korunk egyik modern csúcstechnológiájára gondol, másrészt a média jóvoltából gyakran társít negatív üzenetű képzeteket különösen a mezőgazdasági biotechnológiához. A biotechnológia társadalmi megítélését sokban rontja a genetikailag módosított szervezetek (GMO-k) mezőgazdasági alkalmazását tiltó hazai törvényhozás, illetve a célzatos félretájékoztatás, hisztériakeltés. Ugyanis a GMO-k nemesítése során géntechnológiai és *in vitro* szövettenyésztési módszereket is használnak, amelyek a biotechnológiai fejlesztések kiemelt jelentőségű elemei. A biotechnológia és géntechnológia a köztudatban sokszor ugyanazt jelenti. Ez az átfedés azonban csak egyik megnyilvánulása annak, hogy a biotechnológia számos tudományterület eredményeit hasznosítja, és technológiai megoldásokban igen különböző szakmák tevékenységére épít.

Mi, magyarok, hajlamosak vagyunk megfélemleni elődeink nemzetközileg is jelentős felfedezéseiről, kezdeményezéseiről. Ez történt a „biotechnológia” mint ipari tevékenység első megfogalmazásával, hiszen általánosan kevésbé ismert, hogy ez a szóösszetétel Ereký Károly (1878–1952) magyar gépészmérnöktől származik. Fári Miklós Gábor professzor kutatásainak köszönhetően egyre többet olvashatunk arról, hogy „a biotechnológia fogalmának megalkotójának munkássága” milyen új gondolatokkal és technológiai újításokkal szolgált (Innotéka, 2011. augusztus–szeptember; http://www.innoteka.hu/cikk/a_biotechnologia_fogalom_megalkotojanak_munkassaga.113.html). Ereký a „biotechnológia” szó párosítást 1917-ben, egyik előadásában használta először, amikor „munkagépről”, „élő munkagépről”, végül „biotechnológiai munkagépről” beszélt. Mint Fári Miklós Gábor és Kralovánszky Ubul Pál *90 éves a „biotechnológia”: az új tudományt megálmodó Ereký Károly elfeledett elméleti és gyakorlati munkássága* című tanulmányából megtudhatjuk, Ereký megfogalmazása szerint a biotechnológia a „*munkaszervezés tudomány (technológia) új, az élő szervezetekkel, más szóval biológiai munkagépekkel foglalkozó ága*”, amely hasznosítható termékeket állít elő (http://www.ms.sapientia.ro/~kertes/public/files/Oktatok/Benedek%20Klara/tantargyak/biotechnologia/cikkek/Ereký_Karoly.pdf). Ereký polihisztorként nagyon fontosnak tekintette a mezőgazdaság és élelmiszer-termelés eredményességének növelését. Ez napjainkban is az egyik legjelentősebb kihívás, amivel az emberiségnek szembe kell néznie. A világ egészében gondolkodott, amikor megállapította, hogy a Föld élelmiszer-termelésének mennyiségét az a növénytömeg határozza meg, amelyet a klorofilltartalmú sejtek termelni képesek. A természettudományok elméleti eredményeire építette fel a biotechnológia három alapkoncepcióját, amelyeket először 1918-ban, a *Biotechnológia* című dolgozatában közölt. Szükségesnek tartotta annak megismerését, hogy sejt- és molekulaszinten egy élő organizmus belső folyamatai révén milyen biológiai törvények alapján, milyen kémiai és fizikai eljárással dolgozza fel az anyagokat hasznos terméké. A biotechnológia általa felvetett második elve arra koncentrál, hogy milyen módon lehet tökéletesíteni ezen organizmusok belső munkáját a hasznos végtermék előállítására érdekében. A biotechnológia elveinek harmadik alaptétele az, hogy a biotechnológia elméleti és gyakorlati fejlődésének gazdasági lét-

alpját a haszon termelése határozza meg. Ereky Károly munkássága elsősorban az agrártevékenység területére esett.

Napjainkban általános érvényűnek az OECD definícióját fogadhatjuk el, miszerint *„a biotechnológia a tudomány és technológia alkalmazása élő szervezeteken, azok részein, termékein vagy modelljein azzal a céllal, hogy megváltoztassunk élő vagy élettelen anyagokat tudás, termékek vagy szolgáltatások létrehozásáért”*. Ez a megfogalmazás szellemiségében sokban megfelel Ereky elképzeléseinek. Nyilván a közel száz év alatt gyökeresen megváltoztak az élő szervezetek működéséről alkotott ismereteink és a technológiai lehetőségek, ami a biotechnológia felértékelődését is eredményezte. Ereky másik igen figyelemreméltó megállapítása az, hogy *„az egész élővilág ugyanazokból a vegyületekből épül fel, az egész élővilág minden egyes sejtje – elkezdve a láthatatlan bacilusoktól föl a legnagyobb szárazföldi emlősig és a terebélyes tölgyfaig – ugyanezekből a szerves és szervetlen építőkövekből áll, csupán a felépítés módjában különböznek egymástól”*. Ma a genomika korszakában kibővíthetjük ezt a gondolatot azzal, hogy az életfunkciókat irányító genetikai program felépítésében és működésében is jelentős hasonlóságokat figyelhetünk meg, ha az evolúciós törzsfa távoli ágain elhelyezkedő élő szervezeteket hasonlítjuk össze. Ezért beszélhetünk egységes biotechnológiai szemléletről és metodikai eszköztárról annak ellenére, hogy megkülönböztetünk piros (orvosi, gyógyszeripari), zöld (agrár- és élelmiszer-ipari) vagy fehér (ipari és környezetvédelmi) biotechnológiát.

A biotechnológia mint gazdasági tevékenység valamennyi területén a működés gazdaságossága elsődlegesen a fehérjék, az enzimek, a sejtek, illetve az élő szervezetek biológiai sajátosságaitól, teljesítőképességétől függ, amit a fenotípus-paraméterek összességének tekinthetünk. A fenotípus alakításában mind a genetikai, mind a környezeti faktorok komplex módon, kölcsönhatásaik révén vesznek részt. Ezért a biotechnológiai tevékenység integráns részét képezi a génállomány folyamatos javítása, valamint a tenyésztési, termesztési technológiák optimalizálása. A genomok célirányos szerkesztését a genomprogramok alapozzák meg. A nagy teljesítményű DNS-szekvenátorok elterjedésének köszönhetően folyamatosan bővül azoknak a szervezeteknek a köre, amelyek esetében ismert a teljes genetikai kód, és informatikai programokkal megbecsülhető a gének száma. Ha a fontosabb természetű növényeinket nézzük, ez az érték 27–47 ezerre becsülhető a fehérjéket és néhány százra a szabályzó szerepet játszó mikro-RNS-eket kódoló gének esetében. A géntechnológia módszereivel lehetőség van a kiválasztott funkciót betöltő fehérjék génjeinek izolálására. Sőt, *in vitro*, kémcsőben módosítható a gének szerkezete, így például a szabályzó DNS-szakasz, az ún. promóter kicserélésével több fehérjetermék szintézise biztosítható, ha ezt a rekombináns DNS-molekulát visszaépítjük a sejtekbe, majd transzgenikus növényeket, köznyelven szólva GMO-kat nevelünk fel. Az új génkombinációt hordozó növényeket számos nemesítési programban felhasználták, és az így előállított GM-fajtákat 2012-ben már 170 millió hektáron termesztették (Dudits és Györgyey 2013).

A biotechnológia szerepvállalása kiemelt jelentőségű a növénynevelésben. Ha elfogadjuk Ereky második elvét, akkor a növénynevelést is biotechnológiai aktivitásnak tekinthetjük, hiszen az elsődleges nemesítési cél a fajták terméshozzájárulásának

folyamatos javítása. Az agrárium területén éppen a növénynemesítők sikerei szolgáltatnak példát arra, hogy a tudományos ismeretek milyen eredményesen jelenhetnek meg újabb és újabb módszerek formájában, ezért sikeres a genetikai teljesítőképesség javítása, és emiatt születnek folyamatosan versenyképes fajták. Nincs ez másként napjainkban sem. Az általánosan és eredményesen alkalmazott nemesítési módszerek, a keresztezés és a szelekció mellett a géntechnológia egyre inkább domináns szerepet kap. Így a molekuláris markerek használata szinte nélkülözhetetlenné vált a precíziós szelekciós munkában. A kromoszómákon térképezett genetikai markerek lényegében DNS-szekvencia információt hordoznak, amelyek kapcsoltságot mutatnak a meghatározott fenotípusos bélyegek megjelenésével. A genomi vagy cDNS-ban korból történő génavadászat során számos fontos agronómiai gén izolálását tette lehetővé a nagy felbontású, molekuláris marker alapú genetikai térképek használata. Míg a genetikai alapok jellemzését szolgáló genomikai módszerek szédítő sebességű fejlődését láthatjuk, addig a fenotípus nagy pontosságú, kvantitatív jellemzésére kevésbé állnak rendelkezésre módszerek. Csak az utóbbi években lehetünk tanúi a fenomika mint független tudományág kibontakozásának. A növények tulajdonságainak képalkotási rendszerekkel való felvételezését nagy egyedszám bevonásával lehet elvégezni. A digitális adatok feldolgozását speciális informatikai programok teszik lehetővé.

A zöld biotechnológia tradicionálisan jelentős ága a növényi sejtek, szövetek tenyésztése sterilen, mesterséges táptalajon. A molekuláris és fejlődésbiológiai ismereteket hasznosító technológiák segítségével számos növény gazdaságos szaporítását valósították meg. Az *in vitro* tenyészetekben történő mikroszaporítás alapját a növényi fejlődési program flexibilitása adja, ami a növényi őssejtek totipotens fejlődési képességén alapszik.

A fentiekén túl a zöld biotechnológiát megalapozó tudományok között kell megemlíteni még a mikrobiológiát, a biokémiát, a biofizikát, az immunológiát és az informatikát. A mérnöki tudományok közül pedig a mérés- és szabályozástechnikát, az üzemtervezést, illetve üzemszervezést. A környezetvédelem és a fenntartható fejlődés kihívásainak megoldásában a biotechnológia szintén szerepet kap. A növényekkel megvalósítható méregtelenítés, az ún. bioremediáció mellett a bioüzemanyag előállítása is sok vonatkozásban megfelel a biotechnológia definíciójának.

A következő fejezetekben a teljesség igénye nélkül mutatjuk be, hogy milyen hagyományokkal rendelkezik Magyarországon a zöld biotechnológia, melyek a jelenleg folyó tevékenység főbb területei, és mitől függ a jövőbeni sikeressége.

A növényi szövettenyésztés kezdetei; mikroszaporító cégek és fejlődésbiológiai kutatások

A növényi szövettenyésztés történetének kezdetei, a koncepcionális alapok megfogalmazása egy magyarországi születésű osztrák botanikushoz vezethető vissza. Gottlieb Haberlandt (1854–1945) professzor Magyaróváron (Altenburg) született, és 1902-ben a Német Tudományos Akadémián tartott előadásában számolt be az izolált

növényi sejtek tenyésztésével kapcsolatos kísérleteiről. A fotoszintetizáló, differenciált sejteket sikerült cukorral kiegészített Knop-oldatban életben tartania, a sejtek azonban nem osztódtak. Vizsgálatai kapcsán felvetette a növényi sejtekből történő növényregeneráció lehetőségét. A sejtek totipotenciáját, vagyis azt, hogy vegetatív sejtekből növényi szervek, azaz hajtások és gyökerek differenciálhatóak, Orsós Ottó (1911–1939), a magyar növényi szövettenyésztés kiemelkedő egyénisége kísérletekkel is igazolta. Karalábégumókból kivágott szöveteken kalluszképződést, a differenciálatlan sejtek burjánzását figyelte meg. A szövetek kivonatával ún. „szervképző” hatást tudott elérni. A hajtásképződést és a gyökeresedést követően talajba kiültethető növényeket nevelt fel. A növényi szövettenyésztetekkel végzett kísérletezés az 50-es években is folytatódott. Rédei György (1921–2008) búzaembriókat és ováriumokat tenyésztett *in vitro*. Maróti Mihály (1917–2009), az ELTE professzora bab gyökér- és hajtáskultúrákat tanulmányozott, és munkásságának köszönhető az első ilyen tárgyú tankönyv, *A növényi szövettenyésztés alapjai* megjelentetése 1976-ban. Tanítványaival együtt szervezték meg az első mikroszaporító laboratóriumokat. Számos mikroszaporítási technológiát sikerült elsősorban a kertészeti növények esetében bevezetni, és több cég is alkalmazta azokat. A hazánkban folyó sejtgenetikai és szövettenyésztési munkákról korai áttekintést ad a Biológiai Tanulmányok sorozatban Dudits Dénes, Maliga Pál és Farkas Gábor szerkesztésében 1979-ben megjelent kötet, *A növényi sejtgenetikai és szövettenyésztési módszerek alkalmazása*.

Az *in vitro* tenyészetekben történő növényeszaporítás többféle fejlődésbiológiai elvet követhet. Ha merisztematikus szövetet tartalmazó növényi részt, gyakran hajtásúcscot használunk tenyésztésre, akkor a hajtások számának megsokszorozódása új oldalhajtások (axiláris hajtások) megjelenésével kezdődhet el. Szaporítás céljából a tenyésztő táptalajra helyezett hajtások alapi részén kifejlődött újabb hajtások, illetve a rügyekkel rendelkező oldalhajtások darabjait lehet felhasználni. A járulékos hajtásképződés serkentésében a citokininek eredményesen használhatók. Amennyiben néhány tized milliméter nagyságú merisztémacsúcból történik a szaporítás, akkor vírusmentes növényeket nyerhetünk. A hazai mikroszaporító laboratóriumok gazdaságos működtetését megnehezíti, hogy általában alacsony a szaporítási ráta, ami a növények rossz túlélési képességével párosulhat. Nagy a műveletek élömunka-igénye, és költséges berendezésekre van szükség. Mivel a növényeket termosztátszobákban, mesterséges megvilágítás mellett neveljük, ez tovább növeli az önköltséget. Az 1990-es éveket követően visszaesett a kereskedelmi mikroszaporító cégek száma, de napjainkban is folytatódik ez a tevékenység, sok esetben nagy hagyományokkal rendelkező laboratóriumok utódaiként. A *Kertész Msz Mikroszaporító Laboratóriumot* 1973-ban alapították Szombathelyen orchidea szaporítására, de azóta kibővült a szaporított növények köre. A 2006-ban alapított *Óbuda Kert Kft.* az Óbuda Kertészeti Kft. szakmai utóda, amely kórokozó-mentesítést és gyors növényeszaporítást végez, elsősorban dísznövények, gyümölcsstermő növények, egynyarú és fűszernövények esetében. A *Flora Kft.* (Kecskemét) jogelődje 1986-ban Gerbera-fajták mikroszaporításával kezdte meg a működését Budapesten. Jelenleg a fás szárú növények közül Rhododendronok, Betula-, Sorbus-, Magnolia-fajták, alma- és őszibarackalanyok, áfonya és

kivi, a lágyszárú növények közül Hosta- és Hemerocallis-fajták, banánok és trópusi vízinövények mikroszaporításához szükséges technológiával rendelkeznek. Az *Álami Gyümölcs- és Dísznövénytermesztési Kutató-Fejlesztő Közhasznú Nonprofit Kft.* érdi Mikroszaporító Laboratóriumát Vértesy Judit alapította az 1970-es években. A laboratórium feladata elsősorban a vírusmentes gyümölcs-szaporítóanyag előállítása volt, a későbbiekben ezek közül a csonthéjas alanyok kerültek előtérbe. A *Fertődi Gyümölcs-termesztési Kutató-Fejlesztő Intézet Nonprofit Közhasznú Kft.* jogelődjeiben mikroszaporítási és vírusmentesítési technológiákat dolgoztak ki Zatykó József vezetésével, elsősorban a bogyós gyümölcsűek számára. Keszthelyen a *Burgonyakutatói Központ* a Pannon Egyetem keretei közt működik. A burgonyanemesítés és fajtafenntartás integráns eleme az *in vitro* szaporítás, amelynek fontos részét képezi a vírusmentesítés. A burgonya szövettenyésztő laboratórium megalapítása Polgár Zsolt nevéhez fűződik. A burgonyanövények *in vitro* fejlődött minigumóval is szaporíthatók, ami a kórokozótól való mentességet biztosítja. A gumóképzés hatékonysága függ a fajtától és a tenyésztéshez használt hormonok kombinációjától (Dobránszki et al. 2008). A kerteseti növények mikroszaporítási módszereinek kidolgozása érdekében jelentős kutatások folytak Magyarországon (Jámborné Benczúr és Dobránszki 2005). Több növény, például az alma vagy a *Philodendron tuxlanum* esetében igazolható a citokininek kiemelt szerepe és más stimulátorok pozitív hatása (Jámborné Benczúr és Márta 1990; Toldi et al. 1996; Tantos et al. 2001; Dobránszki et al. 2005). A *Semmelweis Egyetem Gyógyszerésztudományi Karán a Farmakognózi Intézetben* (korábban Gyógynövény- és Drogismereti Intézet) Verzárné Petri Gizella és Szőke Éva professzorasszonyok a gyógynövények, például a *Datura innoxia* Mill szövettenyésztéseit, illetve az *in vitro* gyógynövénykultúrák hatóanyagképzését tanulmányozzák.

Amennyiben merisztéma nélküli szöveteket viszünk mesterséges táptalajra, az auxin és citokinin típusú növényi hormonok kiválthatják a merisztémák és így a hajtások kialakulását. Az 1. ábra példaként bemutatja, hogy a császárfa (*Paulownia tomentosa*) levélnyelészövegeiben nagyszámú hajtás differenciálódása indítható el indolecetsavat (IES) és thidiazuront (TDZ) tartalmazó táptalajon. Ilyenkor közvetlen organogenezissel járulékos hajtások differenciálódhatnak. Ez a folyamat a legkülönbözőbb növényi szervezetekben váltható ki, és szintén a tömegszaporítás alapjául szolgálhat. A növényi sejtek totipotenciájának kialakulása feltételezi az osztódó sejtek átprogramozódását és az őssejtek megjelenését. *In vivo* az őssejtek a hajtás-, illetve gyökércsúcsi merisztémákban találhatóak, és két megkülönböztetett képességgel rendelkeznek. Egyrészt specializált sejtekké alakulhatnak át, és ezzel biztosítják például a levélkezdeményekhez vagy a gyökér növekedéséhez szükséges sejtutánpótlást. Másrészt önmaguk megújításával fenntartják az őssejtek számát és a merisztéma állapotot. Ezzel teremtik meg annak feltételét, hogy a merisztémák egy életcikluson át működhessenek, és folyamatosan új levelek, hajtások vagy gyökerek alakulhassanak ki. Tenyésztett szövetekben a kalluszsövetek képződése során a táptalajba adott hormonok hatására is kialakulhatnak őssejtek, ami lehetővé teszi a hajtás- vagy gyökérmerisztémák megjelenését, majd a szervek differenciálódását. Morfogenezisre képes kalluszsokat igen sok esetben a 2,4-diklórfenoxiecetsav (2,4-D), egy szintetikus auxin hatásaként nyer-

hetünk. Fajonként, sőt genotípusonként, illetve a kiindulási szövet típusától függően is különböző lehet a kalluszsövetek regenerációs képessége. A gabonafélék éretlen embrióit gyakran használják regenerációra képes tenyészetek indításához (Purnhauser et al. 1987; Felföldi és Purnhauser 1992). A kalászsó eredetű kalluszsövetekből a 2,4-D megvonása után lehetett búzánövényeket regenerálni (Dudits et al. 1975). Jafari és munkatársai (1995) nyár levéllyélből származó kalluszosokban indukálták a növények differenciálódását. A sejtfaluktól megfosztott növényi sejtek, az ún. protoplasztok, szintén tenyészthetők mesterséges táptalajon. A burgonya levéleredetű protoplasztjai például a sejtfal újbóli szintézise után osztódni képesek, és a képződő kalluszsövetekből növények regenerálhatók (Fehér et al. 1989).

A növények egyik fejlődésbiológiai érdekessége, hogy ivaros folyamatok nélkül, a testi sejtekben is elindulhat az embriókra jellemző fejlődési program. A sejt- és szövettenyészetekben differenciálódott ún. *szomatikus embriók* szintén felhasználhatók mikroszaporítási rendszerekben, ezért is fontos megérteni, milyen molekuláris folyamatok zajlanak le az embriogén állapot kialakulása során. Az ilyen kutatásokhoz szükség van olyan növényanyagra, melynek szövettenyészetei embriók differenciálódására képesek (Gyulai et al. 1993). Az MTA Szegedi Biológiai Központ (SZBK) Növénybiológiai Intézetében Dudits Dénes kutatócsoportja a lucerna A2 genotípusra épített kísérleti rendszerrel vizsgálta ennek a jelenségnek a molekuláris és sejtbiológiai alapjait (lásd összefoglaló közlemények: Dudits et al. 1991, 1995; Fehér et al. 2003). Az éveken át tanulmányozott egyik kísérleti rendszer alapját az a megfigyelés adta, hogy az A2 lucernalevél protoplasztjaiból származó sejtek alacsony koncentrációjú 2,4-D (1 μ M) jelenlétében híg, vakuolizált citoplazmával rendelkeznek, és az első osztódások eredményeként gyakran nem alakul ki polaritás, azaz a képződő leánysejtek közel azonos méretűek. Ez a fejlődési út kalluszsövetek kialakulásához vezet. Ha a levélprotoplasztokat magas koncentrációjú 2,4-D-t (10 μ M) tartalmazó táptalajon tenyésztjük, akkor a sejtek kisebb méretűek, sűrű citoplazmával rendelkeznek, és az első osztódás sok esetben aszimmetrikus, egy kisebb és egy nagyobb leánysejtet hoz létre. Ez a polarizált sejtállapot kiindulópontja lehet a szomatikus embriók kialakulásának (2. ábra, Bögre et al. 1990). Egy másik lucerna genotípus (RA3) használatával még jobban lehetett kontrollálni az embrió indukciójának körülményeit (Györgyey et al. 1991; Dudits 1999). Lucernalevél-darabokból 25 μ M naftilecetsav (NES) és 10 μ M kinetin (KIN) hatására agar táptalajon kalluszsövetek képződnek. Ha a kalluszsöveteket hasonló összetételű folyadékkultúrában tenyésztjük, akkor fennmaradt a dedifferenciált sejtállapot. Amennyiben ezeket a sejteket csak rövid időre (5 perc – 3 nap) magas koncentrációjú, 100 μ M 2,4-D és 10 μ M KIN keverékével kezeljük, akkor az embriogén program elindul, és hormonmentes táptalajon szomatikus embriók fejlődnek ki. Lucernasejtek vizsgálatával a szomatikus embriogenezis több fontos sajátosságát lehetett megfigyelni. Így az embriogén választ az jellemzi, hogy a protoplaszt eredetű sejtek korábban osztódnak, a vakuólumuk erőteljesebben lúgosodik, és korábban halmoznak fel indolecetsavat (IES), mint a dedifferenciált kalluszszejték (Pasternak et al. 2000). Több évvel később mások vizsgálatai kiegészítették ezt a megfigyelést. A hajtásmerisztémát jellemző őssejtékben aktív a WUSCHEL (WUS) homeodomain fehérje

génje. Az embriogén kalluszosokban a belső auxin (IES) szint szabályozza a WUS gén kifejeződését, ami a szomatikus embriók kialakulásához szükséges (Su et al. 2009). A nitric-oxid stimulálni képes a sejtosztódások aktivációját és az embriogén sejtek kialakulását (Ötvös et al. 2005). Az embriogén és kallusz típusú sejtekből készített cDNS-molekulák populációinak összehasonlításakor a stresszfehérjék génjei (glutathion-S-transzferáz, PR-10 patogenezis fehérje), az ARF-kis GPT-áz génje vagy a sejtosztódással kapcsolatos riboszomális *S3a* génje megnövekedett aktivitást mutatott mind az embriók indukciója, mind az embriogenezis során (Domoki et al. 2006). Az embriogén sejtállapot kialakulása a tenyésztett testi sejtekben osztódás során következhet be. Így a *sejtosztódási ciklust szabályzó gének és fehérjekomplexek* megismerése nélkül nehéz feltárni e különleges fejlődésbiológiai jelenség sajátosságait. A növények sejtosztódási ciklusának kutatásában új fejezet kezdődött 1991-ben, amikor három kutatócsoport is leköszölte a növényi ciklinfüggő kinázok (CDK) génjeinek sikeres izolálását. A szegedi laboratórium, bécsi kutatókkal együttműködésben, a lucerna génjét klónoztta meg (Hirt et al. 1991). Ezt követte a lucerna ciklin génjeinek izolálása és jellemzése (Hirt et al. 1992). Az SZBK-ban végzett sejt ciklus kutatás nemzetközi elismerését jelentette 1995-ben az Európai Molekuláris Biológiai Szervezet (EMBO) szemináriumának megszervezése Szegeden. Az ehhez kapcsolódó kiadvány *Plant cell division* címmel jelent meg 1998-ban (szerk. D. Francis, Dudits D., D. Inzé. Portland Press, London). A szegedi, éveken át folyó kutatás eredményei hozzájárultak ahhoz, hogy javasolni lehessen egy általános modellt arról, miként vesznek részt a sejt ciklust szabályzó elemek a növények fejlődésének és növekedésének irányításában (lásd összefoglaló cikk Dudits et al. 2011, illetve Magyar Zoltán fejezete).

Mivel a növényi sejt- és szövettenyészetekben teljes értékű, talajba kiültethető növények regenerálhatók, ezért akár a sejtek, akár a protoplasztok hasznos eszközei lehetnek az új génkombinációk létrehozásának és a *nemesítési alapanyagok* előállításának. A Gabonakutató Non-Profit Kft.-ben Mórocz Sándor több évtizede végez szelekciót olyan kukorica genotípusok előállítása érdekében, amelyek rendelkeznek az embriogenezis képességével még protoplaszt eredetű tenyészetekben is (Mórocz et al. 1990). A HE/89 szintetikus genotípus éretlen embrióiból kiindulva sikerült olyan szuszpenziós kultúrát létrehozni, amely hosszabb ideig protoplasztforrásként szolgálhat. A protoplaszt eredetű mikrokolóniákból akár embriogenezissel, akár hajtásregenerációval kukoricánövények nevelhetők fel (részletek Mórocz Sándor fejezetében). A szomatikus embriókkal végzett mikroszaporítás gazdaságilag is életképes lehetőségét bizonyítják azok a technológiák, amelyek Márton László, az Egyesült Államok Dél-Karolinai Egyetemének (University of South-Carolina, Columbia-SC) professzora és Fári Miklós Gábor professzor (Debreceni Egyetem) együttműködéseként kerültek bevezetésre az *olasznád* (*Arundo donax L.*) *tömeges szaporítására*. Az olasz nád jelentős figyelmet kap egyrészt cellulóz alapú bioenergia-forrásként, másrészt a talajok méregtelenítésére alkalmas növényként. A megnövekedett szaporítóanyag-igények kielégítését teszi lehetővé a szomatikus embriók előállítása. A virágzás előtti virágzati buga szöveteiből indított steril tenyészetek rendelkeznek a szomatikus embriogenezis képességével. Kifejlesztésre került az ún. *mesterséges ovárium készülék* (Fári,

P 09 00018 sz. HPO szabadalom, 2009, Budapest), amellyel biztosítható az embriogén állapot kontrollált, folyamatos indukciója és fenntartása, továbbá az ilyen tenyészetekben szinkronizált módon zajlik az ún. „syn-plant” gyökeres növénykéek regenerálása. A forgalmazásra alkalmas szaporítóanyag előállítása a MOP Biotechnológiai Kft. közreműködésével történik. A mikroszaporító tevékenység gazdaságossá tétele érdekében szükség van az automatizálási rendszerek kiterjedtebb használatára. Így a Clonmatic (Hollandia, Kertész Tsz) berendezéssel nagy mennyiségű steril táptalaj készíthető és adagolható. A fejlesztések során bioreaktorok tesztelése is indokolt (Mészáros et al. 2006; Dobránszki et al. 2008).

In vitro nevelt dihaploidok a növénynemesítésben

A zöld biotechnológia számos innovatív lehetősége közül az *in vitro* tenyészetekben előállított *homozigóta* növények azok, amelyeket a nemesítési programokban közvetlenül felhasználnak, és amelyek hozzájárulnak az új, versenyképes fajták, hibridek születéséhez. Ezek az ún. dihaploid genotípusok felgyorsítják a gén- és allélvariánsok rögzítését, a genetikai térképezést. A növények nemesítőjének elsődleges célja a termésbiztonság, a termesztett növények biológiai teljesítőképességének folyamatos javítása. Fontos gazdasági növényeinknél jelentős genetikai előrehaladást eredményezhet az ún. *heterózis- vagy hibridhatás*. Ilyenkor az öntermékenyítéssel létrehozott beltenyésztett vonalak keresztezéséből származó hibridek több agronómiai tulajdonságban is felül tudják múlni a szülői vonalakat. Európában elsőként Papp Endre állított elő kukoricahibridet (Mv5) Martonvásáron. A hibridnemesítés hatékonyságát növelheti, ha nem kell 6-8 generáción át végezni az önbeporzást, és felgyorsítható a homozigóta növények előállítása. Erre ad lehetőséget az ivarsejtek totipotenciája azzal, hogy éretlen pollenszemekből a fajra jellemző kromoszómakészlet felével rendelkező növények, haploidok nevelhetők fel akár portok-, akár mikrospóra-tenyészetben. Ha spontán módon vagy kolchicin-kezeléssel megduplázódik ez a haploid kromoszómagarnitúra, az ilyen növényekben homozigóta génállomány alakul ki. A dihaploidokat keresztezve tesztelhető a rekombinálandó képességük, és kiválaszthatók a legnagyobb heterózist biztosító szülői genotípusok. Homozigóta állapotban megjelennek a recesszív gének fenotípusos hatásai, így a gének térképezése eredményesen elvégezhető.

A dohány a szövettenyésztési kutatás tradicionálisan kedvelt növénye, mert könnyen lehet a legkülönbözőbb szöveteiből növényeket regenerálni. A *portok eredetű haploidok*, illetve a homozigóta diploidok előállításában is ezzel a növényvel születtek az első hazai eredmények (Heszky 1974). A gabonafélék sejtjeiben sajnos sokkal nehezebb az embriogén fejlődési út kialakítása, és ez a képesség fajonként, sőt genotípusonként is igen jelentősen változik. Mégis, rövid időn belül sikerült rizs haploidokat is előállítani (Heszky–Pauk 1976; Heszky et al. 1991). Ezek a kutatások vezettek el a *DÁMA rizsfajta* (1992) megszületéséhez, amely az első biotechnológiai úton előállított fajta Magyarországon, amelyet két évtizeden át termesztettek (Heszky et al. 1996). Érthető okokból a kukorica és a búza portoktenyészetek kutatása a két leg-

jelentősebb hazai gabonanemesítő intézetben folyik intenzíven. A Barnabás Beáta vezette kutatócsoport kínai származású tenyésztésanyagokból (Chi592) keresztezte át az androgenezis képességét a maratonvásári elit beltenyésztett törzsekbe (Barnabás 2003; Barnabás et al. 2005). A haploid indukciós gyakoriság egyértelmű genotípusfüggést mutat, és a kalluszszövetek akár embriogén, akár organogén választ adhatnak (Spitkó et al. 2006). A genetikai meghatározottság teszi lehetővé, hogy nemesítést lehessen végezni a javított *in vitro* haploid indukciós, illetve regenerációs képesség kialakítása érdekében. A korai ultrastruktúra vizsgálatok szerint a vegetatív sejt vesz részt a többsejtes pollen kialakításában, amelyekből embrioidok fejlődhetnek (Barnabás et al. 1987). A mikrotubulust gátló kolchicin jó hatékonysággal alkalmazható a haploid genom megduplázására és homozigóta kukorica növények előállítására (Barnabás et al. 1999). A kukorica portoktenyészteteket sikeresen lehetett felhasználni az oxidatív stresszel szemben toleráns dihaploid növények szelekciójára, stresszt indukáló vegyületek jelenlétében (Ambrus et al. 2006). A kukorica biotechnológiájához hozzátartozik, hogy izolált éretlen pollenszemekből, mikrospórákból is haploid növények nevelhetők fel (Szarka et al. 2001).

A búza portok- és mikrospóra-tenyésztetek mindkét intézetben kiemelt kutatási objektumok. Az egyedi kromoszómakicserélődéseket hordozó búzavonalak segítségével meg lehetett állapítani, hogy a 7A és az 1B kromoszómáknak erős hatásuk van a kalluszképződésre, míg a 3A és 2D kromoszómák jelenlétében a zöld növények regenerációs gyakorisága változott (Szakács et al. 1988). Sági és Barnabás (1989) kimutatta a citoplazma hatások jelentőségét a búza portokkultúrák produkciójában. Pauk János, Kertész Zoltán és Barabás Zoltán szegedi kutatók 1988-ban közölték, hogy búzanövényeket neveltek fel portokkultúrában (Pauk et al. 1988). Később értékelték a dihaploid vonalak agronómiai sajátosságait (Lökös Tóth et al. 1997). Ezekből a munkákból született meg a *GK Délibáb* nevű minősítéssel rendelkező fajta, amelynek létrehozásakor a haploid technológiát kombinálták a hagyományos nemesítési műveletekkel (Pauk et al. 1995). A maratonvásári búzanemesítésben is szerepet kapnak a biotechnológiai eljárások (Bedő et al. 1999). A gabonafélék, így a búza termése, az érett szem kifejlődése a megtermékenyítéssel veszi kezdetét. E gazdaságilag is jelentős biológiai folyamat megértését segítheti, ha *in vitro* tenyésztetekben tudjuk vizsgálni az izolált petesejtek megtermékenyülését, a zigóta fejlődését. A maratonvásári kutatók sikeresen izoláltak életképes búzapetesejteket a német együttműködő partnerrel, majd az ivarsejtek elektrofúziójával osztódásra képes zigótát hoztak létre (Kovács et al. 1994, 1995). Kedvezőbb és hatékonyabb kísérletezést tesz lehetővé, ha a megtermékenyítést *in vivo* végezzük el, és a kipreparált zigótát tenyésztjük. Bakos és munkatársai (2003) a fertilis búzanövények izolált zigótákból történő felneveléséről számoltak be, amelyeket mikrospóra eredetű dajkasejtek jelenlétében tenyésztettek. A nem rokon növények hibridjei értékes nemesítési tenyésztésanyagokkal szolgálhatnak. A távoli hibridizációt a megtermékenyítést kísérő összeférhetetlenség jelentősen korlátozhatja. Ezért igen izgalmas az a lehetőség, hogy a kukoricapollennel megtermékenyített búzazigótákat tenyésztésben lehet nevelni. Ez a beavatkozás lényegében aktiválta a búzapetesejteket, és haploid növények fejlődtek. A rizspollennel történt megporzásból a

haploid, illetve dihaploid búza genomméretével rendelkező növényeket sikerült felnevelni. A kialakult genomok flow citometriával történő jellemzése nem ad információt arról, hogy történt-e génátépülés ezekben a zigótákban (Bakos et al. 2005; Bakos 2007). A tenyésztésben nevelt petesejtek, illetve zigóták speciális objektumok lehetnek az idegen DNS mikroinjektálásához is (Pónya et al. 1999).

A portokkultúrák nyújtotta lehetőségeket további növények esetében is hasznosítják. Így Monostori és munkatársai (2003) az árpamikrospórák hormonmentes tápoldattal történő tenyésztésével tudtak embriókat differenciálni. A paprika portokkultúrák esetében szintén kimutatható volt a genotípusfüggő indukciós gyakoriság (Mitykó et al. 1995). Érdekes, hogy ebben a rendszerben is, hasonlóan a lucerna szomatikus embriogenezishez (Györgyey et al. 1991) megfigyelhető a hősokk fehérjéjén aktivációja (Bárány et al. 2001). Ezek a megfigyelések megerősítik, hogy a fejlődési út átprogramozódásában a stresszhatások komoly szerepet játszanak. Összefoglalva megállapítható, hogy a zöld agrár-biotechnológia területén az ivaros reprodukcióhoz tartozó szervek tenyésztési technológiáinak kidolgozása jelentős kutatási kapacitást vonzott hazánkban, és az ezen az úton előállított genotípusok új fajták nemesítésében hasznosultak és termesztésre is kerültek.

A sejtfaltól megfosztott sejtek, a protoplasztok virágkora: szomatikus hibridek és cibridek

Az Ereky által megfogalmazott koncepcióval összhangban a genetikai képességek javítása központi tevékenységi terület a zöld biotechnológiában is. Ezekben a törekvésekben számos technológia szerepet kap, és jól követhető a beavatkozások hatékonyságának és precizitásának folyamatos javulása. Maga a hagyományos növénynevelés intuitív tevékenység, hiszen ismeretlen gének és azok véletlen rekombinációja határozza meg a fenotípus tulajdonságjegyeit, és csak ezek vizsgálatával tud a nemesítő szelektálni az új fajták előállítása során. A siker alapja az, hogy a szelekciót milyen genetikai variabilitásra lehet építeni. A keresztezés ezért első számú eszköz a nemesítő kezében, ide értendők a távoli keresztezések is, amelyek jelentősen bővíthetik a genetikai források körét. Sokszor fontos lehet az ivaros keresztezés evolúciós határainak átlépése. Ezzel is indokolható az a nagy érdeklődés, ami az 1970-es években a *szomatikus hibridizációt* világszerte kísérte. A növények testi sejtjeit sejtfa határolja, ezért a sejtek egyesítésének feltételeként a sejtfa átmenetileg el kell távolítani, és a membránnal határolt sejteket, az ún. protoplasztokat kémiai vagy fizikai kezelésekkel egybeolvasásra, fúzióra lehet kényszeríteni. A szövettenyésztési módszereknek köszönhetően a hibridsejtekből szomatikus hibrid növényeket nevelhetünk fel (lásd Dudits 1982; Dudits–Heszky 2000).

Magyarországon az SZBK két kutatócsoportja vett részt aktívan a növényi protoplasztokkal kapcsolatos kutatásokban, a módszerek bevezetésében és fejlesztésében. Amikor az SZBK vezetői felismerték a növényi protoplasztok használatában rejlő lehetőségeket, Garay András biofizikus professzort küldték ki Japánba az izolálási mód-

szerek megismerése céljából. A protoplasztokat használó szomatikus sejtgenetikai projektek azonban akkor indultak meg igazán, amikor két csoportvezető visszatért külföldi tanulmányútjáról. Maliga Pál Tübingenben G. Melchers professzor laboratóriumában sajátította el a dohány protoplasztok magas kalcium és lúgos pH kezelésével történő fuzionáltatásának módszerét. Dudits Dénes pedig 1972-ben kapott lehetőséget egy egyéves kanadai tanulmányútra, Saskatoonba. Ott, a Prairie Regional Laboratoryban K. N. Kao, kínai származású kutató ebben az időben fedezte fel, hogy a polietilén-glikol (PEG) kalcium jelenlétében alkalmas a növényi protoplasztok hatékony fuzionáltatására. Ezt a módszert Dudits Dénes az elsők között tanulhatta meg, és használta a tenyésztett sárgarépa-sejtek protoplasztjainak egybeolvasztására. Az embriogén szuszpenziós kultúrából izolált protoplasztok egymás közötti, *homokarion fúziójából* származó sejtekből poliploid növényeket sikerült felnevelnie (Dudits et al. 1976). A poliploidizációnak ez a módszere alternatívát jelenthet a kolchicinnel történő genommegsokszorozási módszer mellett. A szegedi kutatások fontos nemzetközi elismerését jelentette, amikor 1976 júliusában megszervezhettük az International Cell Research Organization (ICRO) kurzusát „*Cell genetics in higher plants*” témában. A kapcsolódó kiadványt a tudományterület legjelesebb képviselőinek tanulmányaival az Akadémiai Kiadó 1976-ban jelentette meg (szerkesztők: Dudits D., Farakas G. L. és Maliga P.).

Maliga Pál és munkatársai szomatikus hibridizációs kutatási programjának közép-pontjában a korábban izolált sztreptomycin-rezisztens dohánymutáns genetikai jellemzése állt (Maliga et al. 1973, 1975). A *Nicotiana tabacum* SR1 (sztreptomycin-rezisztens) és *Nicotiana knightiana* (sztreptomycin-érzékeny) növények protoplasztjainak fúziójával állítottak elő szomatikus hibrideket, és a kloroplasztisz DNS-ének vizsgálatával igazolni tudták, hogy a mutáció a kloroplasztiszhoz köthető (Menczel et al. 1981; Sidorov et al. 1981). További munkájukban az egyik szülői protoplaszt populáció kobalt-60 izotópos besugárzásával ún. *cibrideket* hoztak létre, ami a sejthibridekben a besugárzott szülő sejtmagi DNS-ének eliminációjához vezetett. Ezekben a növényekben az antibiotikum-rezisztencia anyai úton öröklődött (Menczel et al. 1982). A cibridekben a mitokondriális DNS átrendeződését is sikerült kimutatniuk (Nagy et al. 1983). Később igazolták a kloroplasztisz genom rekombinációját a *Nicotiana tabacum* SR1 sztreptomycin-rezisztens és *N. plumbaginifolia* LR400 linkomicin rezisztens mutánsok fúzióját követően (Medgyesy et al. 1985). A citoplazmatikus öröklődéssel kapcsolatos kutatásaikat Maliga Pál és Sváb Zóra a 80-as évek második felétől az Amerikai Egyesült Államokban folytatta. Egy másik fúziós rendszerben Márton László demonstrálta, hogy a nitrát-reduktáz-hiányos mutáns növényregenerációs képessége helyreállítható egy albínó mutánssal történt szomatikus hibridizációval (Márton et al. 1985).

A Dudits Dénes által vezetett kutatásokban éveken keresztül az embriogén sárgarépa-sejteket használták protoplasztforrásként. A fúzióból származó hibrid növények azonosítása érdekében albínó sárgarépa mutánst állítottak elő, amelynek tenyésztett sejtjei embriogenezis képességgel rendelkeztek. A sejthibridizációs programban egyre növelték az evolúciós távolságot a szülői fajok között. Elsőként morfológiai bélyegek és izoenzim markerek alapján igazolták a *Daucus carota* és a *D. capillifolius*

közötti fajhibridek kialakulását a szomatikus hibridizációt követően (Dudits et al. 1977). Más nemzetségekhez tartozó fajok bevonásával is megkísérelték a fúziós termékek előállítását (Dudits et al. 1980). Az albínó sárgarépa mutáns tenyésztett sejtjeiből származó protoplasztok és az *Aegopodium podagraria*, az *Angelica archangelica* vagy a *Petroselinum hortense* osztódásra képtelen levél protoplasztjainak fúzióját követően ki lehetett mutatni a hibridsejtek osztódását. Ugyanakkor ezekből a tenyészetekből hibrid növényeket nem sikerült regenerálni. Ezek az eredmények megerősítették azt a feltevést, hogy amíg a dedifferenciált, kallusz típusú sejtekben nem működnek a *szomatikus inkompatibilitási reakciók*, addig a növények regenerációja során az összeférhetetlenség gátolja a szülői genomok funkcionális együttműködését. A szomatikus inkompatibilitás csökkentésére javasolták az *aszimmetrikus szomatikus hibridizációt*, amelyben a kromoszomális instabilitás előidézése és a sejtmagi gének átvitele érdekében a donor protoplasztokat magas dóziszú röntgensugárral kezelték. A sárgarépa és petrezselyem szomatikus hibrid növények a sárgarépa kromoszómakészlet mellett egyetlen petrezselyem kromoszómát hordoztak (Dudits et al. 1980). A dohány- és sárgarépahibridek esetében biokémiai markerek igazolták a génátvitelt, mégpedig úgy, hogy a donorszülő kromoszómáit változó számban lehetett kimutatni. (Dudits et al. 1987). A fúziós programokban jól használhatók a transzgént hordozó genotípusok, amelyek megbízhatóvá teszik a hibridsejtek, illetve -növények azonosítását. Erre jó például szolgál Deák és munkatársai (1988) fúziós kísérlete, amelyben antibiotikum- (kanamicin-) és gyomirtószer- (foszfinotricin-) rezisztens lucernasejtek hibridjeit állították elő.

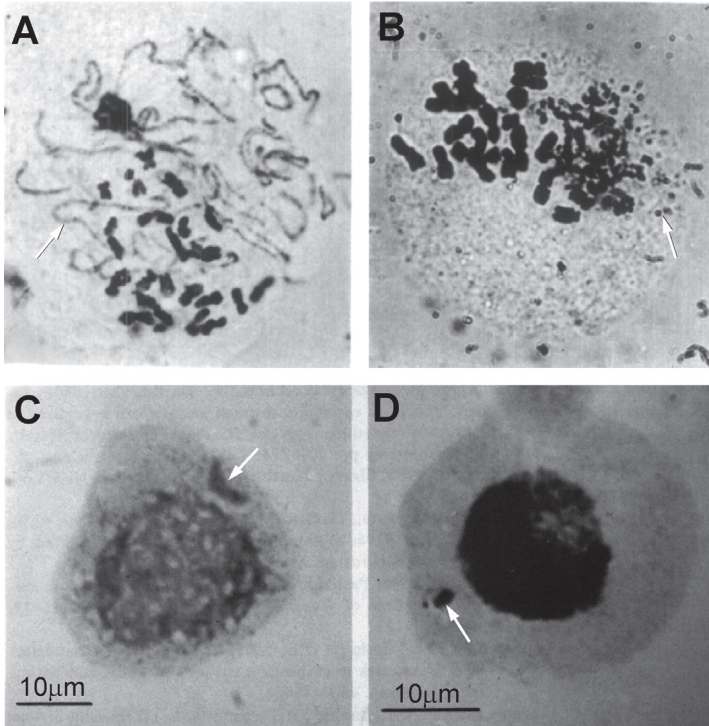
A lehetőségek határait feszegető, de ugyanakkor igen izgalmas fúziós kísérletnek számít, amikor Szarka és munkatársai (2002) albínó kukorica sejtuszuspenzió protoplasztjait búzalevél protoplasztokkal fuzionáltatták (3. ábra). A mutáció kijavítása folytán zöld morfogenezisre képes szöveteket lehetett azonosítani, amelyekből kukorica morfológiájú növények regenerálódtak. A genomi *in situ* hibridizáció teljes búza-kromoszómák jelenlétét ugyan nem mutatta ki, de a kukorica kromoszómákon igazolni lehetett a búza DNS-szigetek jelenlétét. Érdemes ezt a szomatikus hibridizációs terméket összevetni a korábban említett búza x kukorica ivaros keresztezés eredményével (Bakos 2007). A kukoricapollennel beporzott és tenyészetben nevelt búzazigóták haploid kromoszómagarnitúrával rendelkeztek, kevés lehetőséggel arra, hogy a két növény genetikai állománya kevert legyen. Ezzel szemben a testi sejtek fúziója eredményeként a szülői DNS-ek jelentős mértékben keveredtek ebben a fúziós kombinációban.

A tudományos kísérletezés világából térjünk vissza a gyakorlati nemesítés elvárásaihoz egy olyan szomatikus hibridizációs munkával, amelynek termékei bekerültek a nemesítési programba. Király Zoltán akadémikus hívta fel a figyelmünket arra, hogy a *Solanum brevifolium* vad burgonyaváltozat számos rezisztenciátulajdonsággal rendelkezik, amelyeket keresztezéssel nem lehet a termesztett burgonyába beépíteni. Ezért vált indokolttá egy fúziós program elindítása. A Szegeden kiépített kísérleti rendszerekben többféle szelekciós módszert alkalmaztak a hibridek azonosítására a *Solanum tuberosum* L. és *S. brevifolium* Phil. protoplasztok fúzióját követően. Így a levél proto-

plasztokból származó kalluszsövetek közül ki lehetett válogatni a nagyobb méretűeket, amelyek hibrid eredetét 80%-ban igazolta a *S. brevidens* repetitív DNS-ével végzett molekuláris hibridizáció (Polgár et al. 1993). A sejthibridizációs munkák eredményességét növelni lehetett azzal, hogy markert, kanamicinrezisztencia-gént építettünk be a *S. brevidens* szülő genomjába, és a fúzió után antibiotikumot tartalmazó táptalajon neveltük a sejteket, szöveteket. Az ilyen fúziós kombináció az aszimmetrikus hibridizáció tesztelésére is lehetőséget adott, ahol a fúziót letális dózisos röntgensugárzással kezelt *S. brevidens* protoplasztokkal végeztük (Fehér et al. 1992). A kiszelektált hibrid klónok a burgonya alap kromoszómaszámánál ($2n=48$) legalább 12 kromoszómával többel rendelkeztek. A *S. tuberosum* x *S. brevidens* szomatikus burgonya hibridek a vadfaj fagyállóságát is hordozták (Preisznér et al. 1991). A hibrid növények, mint a burgonyanemesítés potenciális alapanyagai, a Polgár Zsolt által irányított keszthelyi Burgonyakutatási Központban kerültek felhasználásra (Kállai et al. 2006). Ettől kezdve ezeknek a növényeknek a sorsa nem különbözik a hagyományos keresztezéssel előállított tenyészanyagokétól. Többszöri visszakeresztezésre van szükség, hogy a kultúrfajtákban csak az értékes tulajdonságok jelenjenek meg. Így érthető, hogy a visszakeresztezők során csökkent az *Erwinia* burgonyapatogén baktériumok által előidézett lágyrothadással szembeni rezisztencia.

A fuzionált sejtekben lejátszódó kromoszómális események alapvetően befolyásolják a hibrid genom felépítését. Érdekes jelenség figyelhető meg, ha mitotikus sejteket interfázisban lévő sejtekkel fuzionálunk. Ilyenkor az interfázisban lévő sejtmagban, annak sejtciklusától függően *korai kromoszómakondenzáció* (Premature Chromosome Condensation, PCC) következhet be (4. ábra). Ezt a jelenséget növényeknél Szabados és Dudits (1980) írta le. A rendellenesen kondenzálódott kromoszómadarabok a további osztódások során könnyebben elveszhetnek, illetve integrálódhatnak.

Mint a nemesítők mindennapi tapasztalata vagy akár az előzőekben bemutatott burgonya szomatikus hibridizáció példája is mutatja, a növényi genomok szerkesztésében szükség van az irányítottság, a specifikusság növelésére. Az ismert funkciójú gének beépítését, transzformációját megelőző fejlesztések egyike az a lehetőség, hogy a teljes haploid (ivaros keresztezés) vagy diploid (szomatikus hibridizáció) genomok génállományának rekombinációja helyett a kívánt tulajdonság kialakításához csak genomrészeket, például kromoszómákat használunk. A Hadlaczký és munkatársai (1983) által közölt protokoll szerint búza és petrezselyem sejtszuspenziós kultúrákban szinkronizáltuk a sejtek osztódását, és a hidroxürea-gátlás feloldása után a mitotikus sejteket kolhicin-kezeléssel halmoztuk fel. Az ilyen sejtpopulációból protoplasztok izolálhatók, és azok feltárását követően tisztított kromoszómaszuspenzió nyerhető. Az *izolált kromoszómák* PEG-kezeléssel felvetethetők a növényi protoplasztokkal, mint azt a citológiai vizsgálatok is igazolják (4. ábra; Szabados et al. 1981). Kromoszómák izolálhatók gyökércsúcsi merisztémákból, és áramlásos citometriával kromoszómaspecifikus fluoreszkáló jelölés után elkülöníthetőek a kiválasztott kromoszómák. Molnár és munkatársai (2011) ilyen módon izolálták az *Aegilops umbellulata* 1. számú kromoszómáját. Az így izolált kromoszómák fontos objektumok a genomszekvenálási programokban.



4. ábra. Genomrészek felhasználása a genetikai információátvitelhez. Korai kromoszómakondenzáció, hosszú kromatinfonalak kialakulása a mitotikus és G1 sejtciklusfázisban levő interfázis bázisejtek fúzióját követően (A). Kromatinfagmentáció a mitotikus és S sejtciklusfázisban levő interfázis bázisejtek fúzióját követően (B). Izolált bázakromoszóma a kukoricaprotoplasztba történt felvétel után (C). Izolált petrezselyemkromoszóma bevitelle bázisejtbe a protoplasztok polietilén-glikol-kezelésével (D) (Szabados et al. 1981)

DNS szekvenciamarkerek és digitális fenotípezálás segíti a szelekciós növénynemesítést

A termést betakarító gazda munkájának eredményessége elsődlegesen a biológiai és az időjárás tényezőktől függ. A gének által irányított élettani és fejlődési funkciók a környezeti hatásokkal kölcsönhatásban vezetnek a fenotípust jellemző tulajdonságok, így a termés kialakulásához. A bonyolult kölcsönhatások rendszerének köszönhetően jelentős a bizonytalanság, ha a felszínen megjelenő tulajdonságok alapján kell genetikai haladást elérni. A sok gén által kontrollált kvantitatív tulajdonságok esetében különösen nehéz a *főhatású géneket*, *kromoszómarégiókat* (QTL: *Quantitative Trait Loci*) azonosítani. A fajta-előállító munkában az elsődleges szelekciós kritérium az egyes genotípusok termőképessége, amit egy adott környezeti háttérben megvalósuló fejlődési program eredőjének tekinthetünk, számos biokémiai, sejtanyagcsere, szerv-

képződési vagy akár alkalmazkodási funkció termékének. A génállomány javításának eredményessége jelentősen növelhető azzal, ha a genomikus és fenotípusos szintek között DNS-szekvencia alapú molekuláris markerekkel követhető a kapcsoltág. A hazai nemesítők a DNS-markereket számos nemesítési programban sikerrel használják, és saját fejlesztéseket is végeznek ezen a területen. Bár a gabonák rozsdabetegségei ellen gombaölő vegyszerekkel lehet hatékonyan védekezni, mégis igen jelentős a rezisztens fajták szerepe, ha csökkenteni akarjuk a vegyszeres növényvédelem alkalmazását. Nehéz korrekt biotermesztést elképzelni a rezisztens fajták használata nélkül. A szárrozsdá ellen tartósan igen hatékony *Sr36* és *Sr31* rezisztenciagének napjainkban a termesztett búzafajták többségében megtalálhatók (Purnhauser et al. 2011a). A levélrozsdával szembeni gének viszont kisebb hatásúak, ezért szükséges több specifikus és nem specifikus rezisztenciagén összeépítése, piramidálása. Manapság a géntechnológia széles metodikai eszköztárat kínál a DNS polimorfizmus kimutatására, ezeket alkalmazási lehetőségeikkel együtt részletesen több tanulmány is ismerteti (Kiss és Endre 1999; Bisztray és Velich 1999; Galiba és Tóth 2006; Purnhauser 2006; Deák 2010). Kezdetben a restriktív fragmenshossz polimorfizmus (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) használata terjedt el széles körben, amely a DNS-szekvencia-specifikus restriktív endonukleázokkal jellegzetes fragmentmintázatot ad. A markerek számának megemelkedéséhez a *polimeráz láncreakció* (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) széles körű alkalmazása vezetett, amely a DNS-molekularészek megsokszorozódását eredményezi (a technika leírása: Dudits 2009). A markerfejlesztések legújabb irányzatai a szekvenciainformációk alapján végzik a polimorfizmus, az allélvariánsok jellemzését. A markerfejlesztést nagymértékben felgyorsították a genomprogramok keretében végzett, számos gazdasági növény teljes genomjára kiterjedő szekvenálási projektek. A kifejlesztett szoftverek segítik a molekuláris markerek alkalmazását. A magyar búzanemesítők a levélrozsdarezisztencia-gének követésére széleskörűen használják a DNS-markereket, akár a visszakeresztezések során, akár diagnosztikai céllal (Błaszczyk et al. 2004; Tar et al. 2008; Vida et al. 2009; Wang et al. 2009; Purnhauser et al. 2011b). Kívánatos, hogy a molekuláris marker a meghatározott rezisztenciagénnel szoros kapcsoltágban öröklődjön, az egyes markerek közötti genetikai távolság 1–10 cM nagyságú legyen. Az 1 cM (centimorgan) azt jelenti, hogy a gének vagy markerek között 1% a rekombinációs gyakoriság. A heterozigóta és homozigóta egyedek szétválasztása érdekében kodomináns markerek használata indokolt. Előny, ha a molekuláris markerek rutinszerűen, a növények nagy egyedszámának bevonásával, elfogadható költséggel alkalmazhatók. A szegedi búzanemesítési program egyes rekombináns vonalaiban mikroszatelita markereket használnak a *Fusarium*-rezisztenciát jelző QTL-ek azonosítására (Mesterházy 2006). Így ismert, hogy az egyik legjelentősebb rezisztenciaforrás, a Sumey-3 két hatékony QTL-lel is rendelkezik a búza 3BS és 5A kromoszómáin.

A korai vizsgálatokban nyárfa tenyészanyagok genotipizálására RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) és AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) módszereket használtak (Törjék et al. 2001). A Pannon Egyetem Növénytudományok és Biotechnológiai Tanszékének munkatársai a Burgonyakutatási Központ nemesítőivel együttműködés-

ben RAPD markereket azonosítottak a *burgonya Y vírus* rezisztenciagén analízisére. A vad *Solanum stoloniferum* fajból származó gén nemesítési jelentősége igen nagy, mivel erős rezisztenciát képes kialakítani. Cernák és munkatársai (2008) olyan markert azonosítottak, amely a rezisztenciagéntől 0,53 cM távolságra helyezkedik el. Ez a kutatóközösség az intronokhoz kötött (Intron Targeting) markerek kidolgozásával fontos fejlesztést végzett a burgonya genotipizálásához (Pocza et al. 2010). A burgonyanemesítési programokban ezek a génspecifikus, kodomináns markerek az allélek nukleotid variánsainak kimutatására, genetikai térképezésre, illetve markeralapú szelekcióra alkalmasak. Figyelmet érdemel Deák Tamás PhD-értekezése (Deák 2010). A szőlőnél a magnélküliség egyik típusában a domináns inhibitor gén (SdI) játszik irányító szerepet, amihez a SCC8 SCAR-CAPS (szekvenciajellemezett amplifikált régió [Sequence Characterized Amplified Region]) marker kapcsolható. Galbács és munkatársai (2009) mikroszatellit markereket használtak a szőlőfajták azonosítására.

A DNS-markerek kiemelt szerepet játszanak a genetikai térképek készítésekor, amiről Kiss és Endre (1999) tanulmánya nagyon részletes, kiváló ismertetést ad. A RAPD és RFLP markereket morfológiai és fiziológiai bélyegekkel kombinálva Kiss György Botond és munkatársai megszerkesztették a lucerna genetikai térképét (1993). A *nagy felbontású genetikai térképek* fontos szerepet töltenek be a növényi gének izolálásakor (Endre et al. 2002a,b). A mennyiségi tulajdonságok kialakításában részt vevő kromoszómaregiók (QTL) térképezése is széleskörűen használja a DNS alapú molekuláris markereket. Az abiotikus stresszekkel szembeni reakciókat befolyásoló búza QTL-ek azonosításáról Galiba Gábor és Tóth Balázs (2006) kitűnő összefoglalást közölt.

A nagy felbontású genetikai térképek, és a növényi genomokra kiterjedő szekvenciainformációk a génkifejeződési vizsgálatok (DNS-chip technológia) hatalmas adatbázisaival kiegészülve mind azt tanúsítják, hogy a genetikai faktorok működésének megismerését egyre fejlettebb, nagy teljesítményű csúcstechnológia (pl. az új generációs DNS-szekvenátor) szolgálja. Ugyanakkor a fenotípus bélyegeinek kvantitatív jellemzésére használt módszerek esetében korántsem láthatunk hasonló jelentőségű innovációt. Ezt az aránytalanságot mérsékelheti, hogy kibontakozóban van a *fenomika mint független tudományterület*, amely a képalkotási technológiákra alapozva teremt meg a morfológiai, növekedési vagy fiziológiai paraméterek nagy számban történő felvételezésének, az adatok tárolásának és informatikai feldolgozásának feltételét. A fenomika eszköztára fokozatosan épül be a növénybiológiai kutatási folyamatba, de fontos szerephez jut a növények nemesítése során is. Magyarországon Dudits Dénes és Vass Imre kezdeményezésére épült meg az ún. *Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszer*. Ez a részben automatizált, komputervezérelt fenotipizáló egység 2005-től kezdte meg működését Szegeden, a Gabonakutató Kft. üvegházában, a Búzakalász Konzorcium pályázat keretében. Az ottani kísérleteket Pauk János irányította. Később kiépítésre került egy másik egység is, az SZBK-ban. Mint az 5. ábra szemlélteti, ezek a rendszerek alkalmasak több nézetből digitális felvételek készítésére. A tenyészidő alatt végzett többszöri felvételezéssel a zöld pixel alapján a növények morfológiai paraméterei és zöld tömege határozható meg. A hőkamerás vizsgálat a növények, elsősorban a búza és árpa genotípusok szárazságstresszre adott reakcióinak követé-

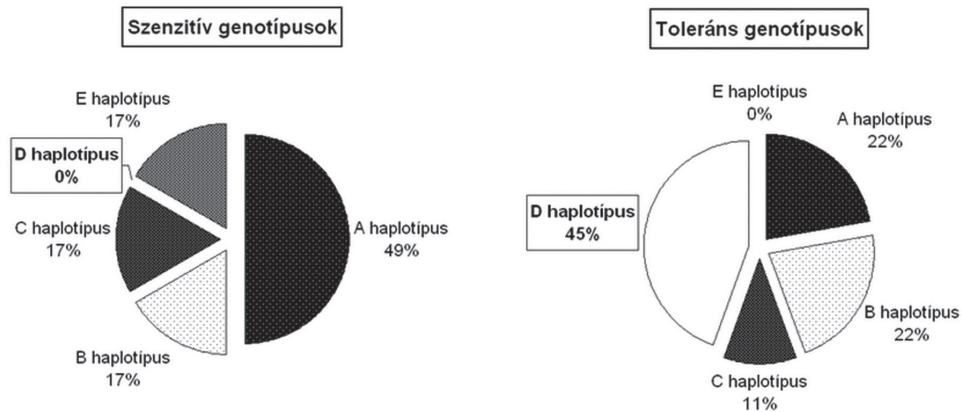
1. táblázat. Az árpa HvA1 gén haplotípusaiban megtalálható polimorfizmusok és főbb jellemzőik

	1.S	2.S	3.S	4.S	5.S	6.S	7.S	8.S	1.I	9.S	10.S	11.S	12.S	2.I
Szekvencia (adatbázis)	G	A	G	C	C	G	C	G	33bp	G	G	G	G	---
A haplotípus	G	A	G	C	C	G	C	G	33bp	G	G	G	G	---
B haplotípus	G	A	G	C	T	G	C	G	33bp	G	G	A	A	---
C haplotípus	C	A	G	T	T	A	G	C	33bp	G	G	G	A	---
D haplotípus	C	A	C	T	T	A	G	C	33bp	C	G	G	A	CCA
E haplotípus	A	G	G	T	T	A	G	C	---	-	A	A	A	---
Nukleotidcsere	G/C/A	A/G	G/C	C/T	C/T	G/A	C/G	G/C	33 bp/-	G/C	G/A	G/A	G/A	-/CCA
Exon/intron	I	I	I	I	I	I	E	E	E	E	E	E	E	E
Aminosavcsere	Q/D	Q/D	11aa	Q/H	A/T	T/T	A/T	-/T

Jelmagyarázat: A – adenin, C – citozin, G – guanin, T – timin; I – inzerció, D – delécio; E – aminosavcsere, A – alanin, D – aszparaginsav, H – hisztidin, Q – glutamin, T – treonin (Cseri et al. 2013)

sét teszi lehetővé. Az 5. ábra bemutatja, hogy vízhiányban megnő a levelek hőmérséklete, hiszen a légzőnyílások bezáródásával csökken a párologtatás hűtő hatása. A fotoszintézis folyamata is sérül szárazság esetén. A klorofill fluoreszcencia értékek az elektrontranszport hatékonyságáról tájékoztatnak. A digitális adatok kezelésére és feldolgozására Sass László fejlesztett ki programokat. A rendszer alkalmas arra, hogy a növények öntözését automatikusan, komputervezérléssel végezze. A számítógép alkalmanként rögzíti az egyes növények által felhasznált víz mennyiségét, így ismert a tenyészidő alatt elfogyasztott összes víz mennyisége, és jellemezhető a genotípusok vízhasznosító képessége.

Érthető, hogy az üvegházban, tenyészeményekben nevelt növények különböznek a szántóföldön fejlődő növényektől, ezért megalapozatlan elvárás lenne a termőképesség és bizonyos agronómiai bélyegek jellemzősek a mesterséges körülmények között mért adatokra támaszkodni. Hasonló korlát a fitotronokban is érvényesül. A fenotipizálási berendezések ugyanakkor a nemesítő számára kiegészítő információval szolgálnak a szántóföldi minősítés mellett. A kontrollált növénynevelési környezet azonban nélkülözhetetlen a genotípus-gyűjtemények vagy a keresztezésből származó hasadó populációk jellemzésében, hiszen a növények károsítása nélkül, az adatok precíz felvételezésével segíti a haplotípus-fenotípus kapcsolatok megismerését. Cseri és munkatársai (2013) árpa genotípusok szárazságstressz-toleranciáját vizsgálták a bemutatott Komplex Stressz Diagnosztikai Rendszerrel. Az árpa genotípusokat stresszelt (20% talaj vízkapacitás), illetve normál (60% vízkapacitás) körülmények között nevelték, és a zöld pixel adatok alapján becsült növekedési ütem szerint rezisztens és érzékeny genotípusok csoportjait tudták elkülöníteni. Az egyes kategóriákhoz tartozó genotípusok esetében több szárazsággal kapcsolatos árpagén haplotípusainak, allélvariánsainak azonosítására az *Eco-TILLING* (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) módszert használták, amely PCR lépéseken, heteroduplex képzésen és a



6. ábra. Az egyes haplotípusok előfordulási gyakorisága a szárazságstresszre érzékeny, illetve toleráns árpagenotípusok csoportjában. A D haplotípus a rezisztens genotípusokra jellemző, és nem mutatható ki a vizsgált szenzitív variánsok csoportjában (Cseri et al. 2013)

szekvenciaeltérések nukleázokkal történő emésztésén alapul. Példaként az árpa *HvA1* gén EcoTILLING analízisének eredményét mutatjuk be. Ez a gén egy LEA (Late Embryogenic Abundant) fehérjét kódol. Az 1. táblázat szerint a *HvA1* gén 919 bp hosszúságú ampikonjában elkülönített haplotípusok szekvenciájának összevetése nyomán 12 SNP (Single Nucleotide Polymorphism), valamint 2 INDEL (Insertion, Deletion) típusú polimorfizmus jelenlétére derült fény. A 6. ábra tanúsága szerint az érzékeny és szenzitív árpa genotípusok között lényeges különbség van a haplotípus összetételében. Az A, a B és a C haplotípus mindkét csoportban megtalálható. Az E haplotípus csak a szenzitív genotípusokban van jelen, még hozzá 17%-os gyakorisággal, míg a D haplotípust hordozó genotípusok (pixel alapú zöldfelület eredményeik alapján) minden esetben a toleráns kategóriába kerültek. Ezen a csoporton belül a D haplotípus aránya eléri a 45%-os mértéket.

A hazai géntechnológiai nemesítés kezdeményezései és az agrárinnováció lehetőségei a GMO-ellenesség fogságában

A mezőgazdasághoz kötődő biotechnológiai fejlesztések legaktívabb területe a géntechnológiával, az izolált DNS-molekulák beépítésével (transzformációjával) történő növény nemesítés. A növényi GMO-k (Genetically Modified Organisms) szinte napi hírként szerepelnek a hazai médiában mint nemkívánatos rosszak. A politikai vagy akár ideológiai viták közepette súlytalaná válnak a szakmai, tudományos, sőt gazdasági szempontok is. Magyarországon napjainkban a GMO-ellenesség valamennyi politikai párt és a kormány támogatásával tombol, és mindez jelentős károkat okoz a kutatásban, az innovációban, és nem utolsósorban a versenyképes, környezetbarát

mezőgazdaság feltételeinek megteremtésében. De a génnemesítés hithű ellenzői által okozott legnagyobb rombolás az emberek tudatában, gondolkodásában érhető tetten. A rövidlátó, szakmaiatlan félrevezetés egyelőre sikerrel jár, amiben a politikai támogatás mellett a Greenpeace aktív támogatásának is nagy szerepe van. Tekintettel arra, hogy az utóbbi években több átfogó tanulmány is készült a génnemesítés módszereiről, a GM-növények előnyeiről és térhódításáról világszerte, a mostani elemzés ezekre a kérdésekre nem tér ki. Részletes információval az alábbi források szolgálhatnak: Dudits Dénes (szerk.) *Zöld géntechnológia és agrárinnováció*, 2009; Venetianer Pál: *Génmódosított növények*, 2010; Balázs Ervin, Dudits Dénes, Sági László (szerk.) *Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében. Magyar Fehér Könyv*, 2011; Dudits Dénes, Györgyey János: *Zöld GMO-k*, 2013; *Zöld biotechnológia hírlevél*, Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület (<http://zoldbiotech.hu>).

Az első GM dohánynövényt leíró külföldi közlemény megjelenését (1983) követően a magyar tudományos közösség is aktív szerepet vállalt a módszerek fejlesztésében és alkalmazásában. Ezt egyértelműen igazolja a GMO Fehér Könyv összeállítása, miszerint 1986 és 2011 között a magyar kutatók 102 nemzetközi közleményt publikáltak a GM-növényekkel végzett kutatásaik eredményeiről. Ez a teljesítmény azt is jelzi, hogy az elmúlt 5–7 évtől eltekintve jelentős pályázati források is támogatták a növényekkel folyó géntechnológiai K+F tevékenységet. Kiemelt jelentőségűnek tekinthetők például a Dudits Dénes által koordinált búzakutatói pályázatok: a „Búza Konzorcium” (2001–2004): *„A hazai búzák adaptációs képességének és terméshozzáértékének javítása”*; a „Búzakalász Konzorcium” (2004–2007): *„A magyar búza aszály- és fagyterhelésének, valamint betegség-ellenállóságának javítása növény-nemesítési, genomikai és biotechnológiai módszerekkel”*; valamint a „Növényi génforrás” német–magyar közös gabonanemesítési együttműködési projekt a NAP-BIO pályázat keretében (2008–2010). Ezek a programok természetesen nemcsak a molekuláris megközelítéseket, de a búzanemesítés valamennyi területét és az agrotechnológiai kutatásokat is érintették. A pályázatok kivételes alkalmat biztosítottak a két legtekintélyesebb búzanemesítő intézmény, az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár és a szegedi Gabonatermesztési Kutató Közhasznú Társaság mint vetőmagpiaci versenytársak, valamint egyetemi tanszékek, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ, az MTA Szegedi Biológiai Központ, továbbá agrárüzemek, vetőmag-szaporító cégek együttműködéséhez. Az egymilliárd forint értékű támogatás hasznosulásának megítélésében segíthet az a tény, hogy az együttműködésben részt vevő búzanemesítők fajtáit a hazai vetőmagpiacon egyedülálló sikerként, a búza vetésterületének 70–80%-án vetik. Nem lehet megkérdőjelezni, hogy a közel egy évtizeden át nyújtott többletforrás hozzájárult a hazai búzanemesítés versenyképességéhez. Az első konzorcium eredményeiről *A búza nemesítésének tudománya – A funkcionális genomikától a vetőmagig* címmel tanulmánykötet jelent meg (szerk. Dudits Dénes, 2006).

A géntechnológiával nemesített élő szervezetekkel (GMO-kkal) kapcsolatban idehaza valamennyi kérdés kulcsát a parlament által 2011. április 25-én elfogadott *Magyarország Alaptörvénye* jelenti, melynek XX. cikke:

„(1) Mindenkinnek joga van a testi és lelki egészséghez.

(2) Az (1) bekezdés szerinti jog érvényesülését Magyarország genetikailag módosított élőlényektől mentes mezőgazdasággal, az egészséges élelmiszerekhez és az ivóvízhez való hozzáférés biztosításával, a munkavédelem és az egészségügyi ellátás megszervezésével, a sportolás és a rendszeres testedzés támogatásával, valamint a környezet védelmének biztosításával segíti elő.”

A fenti szövegezés ellentmondásainak jogi elemzése megtörtént (Hetényi 2011). Ugyanakkor a törvényhozók meg lehetnek elégedve, hiszen még Heszky László akadémikus, a biotechnológia professzora is azt írja, hogy „az alkotmány célja pillanatnyilag elfogadható, mert a növényi géntechnológia, mint új kutatási és fejlesztési irány által előállított termékei (GM-fajták és -hibridek) valóban több sebből véreznek, félkész termékeknek tekinthetők, és termesztésük sokféle kockázattal jár. Ez azonban nem jelenti azt, hogy a jövőben ne lehetne előállítani olyan új GM-fajtákat és -hibrideket, melyek valóban a fejlődést szolgálják, az emberiség valós igényeit elégítik ki, és veszélytelenek a környezetre, valamint a fogyasztókra” (Agrofórum, 2013. november). Ez a vélemény kétarcú, és hosszú távon is nagy kárt okoz a zöld biotechnológia társadalmi elfogadottságának. A félrevezetés ott kezdődik, hogy miként beszélhetünk GMO-mentes magyar mezőgazdaságról akkor, amikor évente 600–700 ezer tonna szójadarat és 70–80 ezer tonna olajos-mag-származékot importálunk. Az országba behozott szójadara 90%-a GM-terméket tartalmaz. Visszás, hogy a jelenlegi kormányzat a GMO-mentes Magyarországot reklámozza, miközben a magyar állattenyésztés GM-szójafüggő, ilyen takarmány-összetevőket már több mint egy évtizede használ (Popp és Potori 2011). Nyilván a szóját tartalmazó élelmiszerek esetében is számolhatunk génnemesített növények termékeivel, hiszen a fő exportőr országokban 80–90%-os a GM szójafajták részesedése. Ami a GM-szóják hazai termesztésének tiltását illeti (lásd Alaptörvény), igencsak megdöbbenő a csúsztatás. Az import szóját fogyaszthatjuk, de ha ugyanazt a terméket a magyar gazda állítaná elő, akkor az már veszélyeztetné a testi és lelki egészségünket. Ami a jelenleg termesztésben lévő GM-fajták és -hibridek egy kalap alatti leminősítését illeti („valóban több sebből véreznek, félkész termékek”), érdemes figyelembe venni, hogy 170 millió hektáron, 17 millió gazdálkodó haszonnal természetesen ilyen „félkész termékeket” a világ számos országában (Brookes–Barfoot 2012a, b). Ezek már most a világ élelmezését szolgálják, és igazolható környezetvédelmi előnyökkel bírnak. Az igen szigorú engedélyezési eljárásoknak köszönhetően az eddig engedélyezett termékek nem jelentenek egészségügyi kockázatot, mert ennek ellenkezőjére semmiféle tudományosan megalapozott bizonyíték nincs.

Nagy kérdés, hogy mikor következik be az a pillanat, amikor a hithű GMO-ellenzők tökéletesnek mondanak majd bármilyen génnemesített növényt. Így aztán a Heszky László által említett alaptörvény-módosításra jócskán várhatunk! Eközben a növényi biotechnológia jelentősége erodálódik, tekintélye igencsak csorbul a magyar emberek szemében. Köszönjük, professzor úr! A társadalom és a politikusok félrevezetéséből megszületett hibás Alaptörvény káros hatásai már most kézzelfoghatóak. A kormányzati akarat kikényszerítésének áldozata az elbocsátott Popp József professzor, aki a GMO-technológia jelentőségéről mert nyilatkozni. A kutatóknak több intézménynél megtiltották, hogy nyilvánosan pozitívan foglaljanak állást GMO-témában. Termé-

szetesen ismertek a biztos, hivatásos GMO-ellenzők, akik többek mellett kormányzati szervezésben országos „road show”-kon kárhoztatják a GM-növényeket. A kialakult helyzetben sajnálatos, de érthető, hogy a növénytudományok, a zöld biotechnológiai K+F tevékenység veszít a vonzerejéből. A tehetséges egyetemisták húzódoznak attól, hogy ezeket a területeket válasszák. Nyíltan nem, de a háttérben jócskán megnehezül támogatást nyerni a növényes géntechnológiai pályázatokra.

Egyértelműen megállapíthatjuk, hogy a korábbi évtizedek tudományos sikerei (102 közlemény) ellenére egyre mélyebb válságba kerül a hazai génnemesítés, a zöld biotechnológia fontos ága. Természetesen joggal kérdezhető, hogy a korábbi tudományos közlemények mellett hány hazai szabadalom született és került hasznosításra. A 2. táblázat felsorolja azokat a szabadalmakat, amelyeket a magyar kutatók egy korábbi körkérdésre válaszolva megadtak. Mielőtt bárki minősítené ezt a teljesítményt, fontos felhívni a figyelmet arra, hogy a hazai egyetemi és kutatási intézmények legtöbbször már a szabadalmaztatás költségeit sem tudják vállalni. Ha figyelembe vesszük, hogy egy GM-fajta kifejlesztése és engedélyeztetése több százmillió dollárba kerülhet, be kell látnunk, hogy reménytelen elvárás a kizárólag magyar fejlesztésből származó vetőmag. Az egyedüli út, hogy mind növénynemesítőink, mind kutatóink nemzetközi együttműködések révén résztvevői legyenek a világon folyó innovációnak. Ekkor találkozunk szembe azzal a ténnyel, hogy a harcias GMO-ellenesség igen gyakran összemosódik a globalizáció, a multinacionális világcégek elleni küzdelemmel. Az aktivisták ilyenkor nem veszik tudomásul, hogy a GM-ügy miatt kiátkozandó multik, a Monsanto, a Pioneer, a Dow Chemicals, a Syngenta, vagy a Bayer nemcsak a GM-növények legjelentősebb előállítói és forgalmazói, de egyben a jelenlegi hagyományos magyar vetőmagpiac kikerülhetetlen szereplői is. Teljesen érthető, hogy a versenyképesség érdekében a magyar nemesítők nemzetközi együttműködésben kezdeményezték a GM hibrid kukorica előállítását. Ilyen formában született az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézetében az első transzgenikus marionvásári hibrid, az *Mv 500 Bt*, amely Magyarországon 2005-ben kapott állami elismerést, s került be az Európai Unió közös katalógusába, amely az EU valamennyi tagországában forgalmazási jogot biztosít. Ez a hibrid a kukoricamoly-ellenállóság génjével rendelkezik, és a molykártétel növekedése folytán termesztése a környezetvédelmi kedvező hatás mellett gazdaságossági előnyt jelentene hazánkban is. Különösen, ha figyelembe vesszük, hogy ezek a GM hibridek kevésbé vannak kitéve a *Fusarium*-fertőzésnek. Mégis, a mostani körülmények között tanácsos mélyen hallgatni erről a genotípusról még akkor is, ha a gazdák érdeke ezt kívánná.

A magyarországi alapkutatáshoz köthető külföldi együttműködési K+F eredményre olyan példát is találunk, amely a sikerrel termesztett GM kukoricahibridek nemesítésének alapját képezte. A történet 1984-ban kezdődött, amikor Dudits Dénes kezdeményezésére az MTA SZBK kutatási megbízást kapott a frankfurti Hoechst cégtől. Az akkori szabályok szerint az intézet nevében az Akadimpex cég volt a szerződő fél. Ez a K+F együttműködés a rendszerváltás után is folytatódott a jogutóddal, a Hoechst Schering AgrEvo GmbH-val. Az utolsó kutatási megbízásra 1995-ben került sor. A tizenegy éves partnerség alatt többször változott a szegediek által végzett

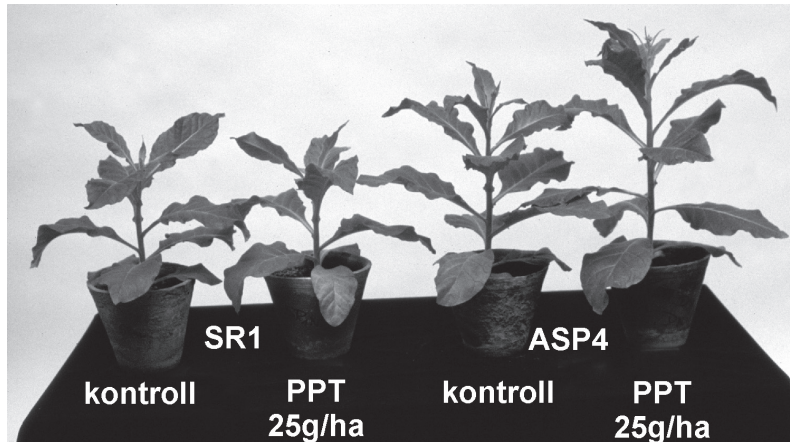
2. táblázat. Hazai kutatáshoz köthető transzgenikus növényekkel kapcsolatos szabadalmak jelenleg ismert jegyzéke

SZABADALOM	DÁTUMA	CÍME	FELTALÁLÓK
P1300602 PCT/ HU2013/000103 P13 0103963	2013. 10. 22. 2013. 10. 30. 2013. 10. 30.	Xanthomonas euvesicatoria rezisztencia gén azonosítása paprikából (Capsicum annuum) és eljárás rezisztenciával rendelkező növények létrehozására	Kiss György Botond, Szabó Zoltán, Balogh Márta, Carmen Iliescu
1300485	2013. 08. 15.	Eljárás gyomirtószer rezisztenciához kötött GMO gyors előtesztelésére a szabványnak megfelelő vetőmag termesztéséhez	Marton L. Csaba, Hadi Géza, Pintér János, Berzy Tamás, Spitkó Tamás, Szőke Csaba, Zsubori Zsuzsanna
	2011. 01. 03.	Növényi petesejt és megtermékenyítés specifikus gének	Barnabás Beáta, Jager Katalin – Martonvásár/SZBK
	2011. 08. 30.	Nanopartikulum alapú állatgyógyászati vakcina	Balázs Ervin, Gellért Ákos – Martonvásár/SZIE/MBK
P0800351	2008. 05. 30.	Szabályozó gének azonosítására alkalmas indukálható Arabidopsis cDNS expressziós rendszer	Szabados László, Koncz Csaba, Ábrahám Edit, Papdi Csaba, Joseph MP
US 7,579,518 B2 EP 1 580 275 B1	2005. 03. 21. 2005. 03. 18.	Plants having improved seed yield and expressing a nucleic acid encoding a small subunit ribosomal (s3a) protein and method	Dénes Dudits, Attila Fehér, Valerie Frankard
US 7,790,956 B2 EP 1 732 378 B1	2005. 05. 25. 2005. 03. 25.	Plants having improved growth characteristics and methods for making the same by modulating expression of a nucleic acid sequence encoding a nap1-like protein	Dénes Dudits, Attila Fehér, Valerie Frankard
P0500811	2005. 08. 31.	Növények stressztoleranciájának javítása	Szabados László, Zsigmond Laura, Koncz Csaba
WO/2004/016775	2004. 02.	Plants having modified growth and a method for making...	Dudits Dénes, Frankard Valerie, Mironov Vladimir, Csordás Tóth Eva, Horváth Gábor
PCT/HU02/00090	2002. 09. 03.	Isolation and use of the desiccation-specific promoter from DS2 gene	Bánfalvi Zsófia, Dóczi Róbert, Csanaki Csilla, Silhavy Dániel, Kondrák Mihály

WO/2001/096579	2001. 12.	A novel plant cyclin	Miskolczi Pál, Pettkó-Szandtner Aladár, Horváth Gábor, Dudits Dénes, Fehér Attila, Györgyey János
P0103697	2001. 09. 13.	A DS2 gén szárazság-specifikus expressziót biztosító promóter szakasza	Bánfalvi Zsófia, Dóczi Róbert, Csanaki Csilla, Silhavy Dániel, Kondrák Mihály
P 98 01674	2000. 05. 29.	Egy Solanum tuberosum eredetű metallokarboxipeptidáz-inhibitor gén gumó- és termésspecifikus ex- pressziót biztosító promóter sza- kasza	Bánfalvi Zsófia, Molnár A., Lovas Á., Molnár G., Lakatos L., Sztankó X.
P0001563	2000. 04. 14	Egy HMW-glutein gén azonosítása, klónozása és jellemzése	Juhász Angéla, Tamás László, Bedő Zoltán, Vida Gyula, Láng László, Karsai Ildikó, Tamásné Nyitrai Cecília
P 98 00280	1999. 10. 28.	Burgonya transzformációs módszer transzgenikus burgonya fajták elő- állítására	Bánfalvi Zsófia, Sztankó X, Hutvágner Gy, Lakatos L, Molnár A, Dóczi Róbert
WO/1999/025852	1999. 05.	Stress resistance gene	Oberschall Atilla, Horváth Gábor, Deák Mária, Török Károlyné, Dudits Dénes, Fehér Attila, Sass László, Hideg Éva, Vass Imre
WO/1998/046775	1998. 10.	Oxidative stress resistance gene	Deák Mária, Dudits Dénes, Török Károlyné, Sass László, Balázs Barna, Király Zoltán
US 005767367A EP 90111945	1998. 06. 16.	Zea mays (L) with capability of long term, highly efficient plant regene- ration including fertile maize plants having heterologous gene and their preparation	Dénes Dudits, Sándor Mórocz, János Németh, Günter Donn
WO/1997/020058	1997. 06.	Plant gene expression vector family based on the regulatory dna sequen- ces of an alfalfa h3 histone gene va- riant (msh3g1)	Kapros Tamás, Dudits Dénes, Györgyey János, Mai Antal, Kelemen Zsolt

kutatás témája. Ezek közül kettőben születtek cikkek, illetve szabadalmak. 1987-től bekapcsolódott a projektbe Mórocz Sándor, a Gabonatermesztési Kutatóintézet munkatársa, aki kandidátusi témájaként a kukorica protoplasztokból történő növényregeneráció és a foszfinotricin (glüfozinát, PPT) gyomirtóval szemben rezisztens GM-kukorica előállításán dolgozott, mind a GKI, mind az SZBK laboratóriumában. Mint a Mórocz Sándor által írt fejezet is bemutatja, Mórocz Sándor egy speciális genotípust (He/89) nemesített ki, amely lehetővé tette fertilis kukoricánövények felnevelését protoplasztokból. Dudits Dénes kutatócsoportja nagy tapasztalatokkal rendelkezett a protoplaszt munkákban, és fúziós kísérleteikre támaszkodva került alkalmazásra a polietilén glikollal történő plazmidfelvétel, transzformáns kukoricánövények előállítása érdekében. A Szegeden végzett munkából közlemény (Omirulleh et al. 1993), illetve nemzetközi szabadalom született (USO05767367, 1998, *Zea mays (L.) with capability of long term, highly efficient plant regeneration including fertile transgenic maize plants having a heterologous gene, and their preparation*, felfalálók: Dudits Dénes; Mórocz Sándor; Németh János; Szeged; Günter Donn; Hofheim am Taunus, Németország). Az együttműködés keretében Günter Donn a Szegeden kifejlesztett HE/89 sejtvonallal és a kidolgozott módszerrel, a közös szabadalom alapján előállította a T25 vonalat (OECD code ACS-ZMØØ3-2), amely kifejezi a bakteriális foszfinotricin acetyl transzferáz gént, ezért az ilyen kukoricák rezisztensek a glüfozinát hatóanyagú totális gyomirtókkal (Basta®, Rely®, Finale® és Liberty®) szemben. Az elsődleges transzformáns T25 vonal aztán keresztezési partnerként szolgált a további nemesítés során, amiből a LibertyLink® hibridek származnak. A T25 kukoricával 1994 óta folynak szabadföldi tesztek az AgrEvo, Aventis Crop Science, később Bayer Crop Science bejelentése alapján. Az Európai Bizottság (98/293/EC) engedélyezte a T25 kukoricák takarmányként történő felhasználását. Később az Európai Élelmiszer Biztonsági Hivatal (EFSA) két kérelem (EFSA-GMO-RX-T25 és EFSA-GMO-NL-2007-46) alapján megállapította, hogy a T25 kukorica élelmiszerként, takarmányként, illetve környezeti tényezőként ugyanolyan biztonságos, mint a hagyományos úton előállított hibridek. A Bayer Crop Science LibertyLink® hibridek piaca az utóbbi években jelentősen megnőtt, mert a glüfozát-rezisztens gyomok elterjedése miatt az USA-ban szükségessé vált az alternatív védekezési eljárás alkalmazása. A LibertyLink® hibridek erre kiválóan alkalmasak. A bemutatott K+F együttműködési projekt sikere láttán felmerül, hogy milyen haszonnal járt a magyar partnerek számára. A 80-as évek második felétől a 90-es évek közepéig a német cégek évenként változó összeggel finanszírozták a Szegeden folyó kutatásokat, ami az akkori hazai kutatástámogatási viszonyokat tekintve jelentős bevételnek számított. A szabadalom közös tulajdonú, és a vetőmag-értékesítés függvényében a Bayer cég jelenleg is jogdíjat fizet, amelyen a GK Non-profit Kft. és az MTA SZBK osztozik.

A LibertyLink® hibrideket eredményező program mellett a kukorica transzformációs szabadalom alapján a szegedi csapat egy másik világcéggel is együttműködött. Miután ismertté vált a Szegeden kifejlesztett transzformációs rendszer hatékonysága, a CIBA-GEIGY Limited (Basel) számára több génkonstrukcióval transzformációt végeztünk az SZBK-ban, ahol Mórocz Sándor keresztezte a GM-növényeket.



7. ábra. Géntechnológiai megoldás a dohánynövények növekedésének serkentésére, és zöldtömegük növelésére. Az ASP4 növények a bakteriális aszparagin szintáz gén kifejeződése következtében nagyobbak a nem GM SR1 növényeknél. Az alacsony dóziszú foszfinotricin (PPT) permetezés az SR1 növény növekedését gátolta, míg a transzformáns ASP4 növényen a stimuláló hatás jól látható

A kezdeti megállapodásban a Hoechst által engedélyezett feltételek miatt több generáción át visszakeresztezést kellett végezni, mielőtt a CIBA-GEIGY cégnek átadhattuk az új genotípusok szemeit. A nagyszámú keresztezés elvégzéséhez nem rendelkeztünk üvegházi kapacitással, ezért a megrendelő finanszírozta az SZBK egyik üvegházának átépítését, 100 ezer dollár értékben. Ez csak ideig-óráig jelentett megoldást, és a CIBA-GEIGY végül a technológia, a HE/(89) tenyészet licenc megvásárlása mellett döntött. A vételár felét, 400 ezer dollárt, a szegedi partnerintézetek kapták. A kukoricatranszformációs rendszer hasznosítására kötött nemzetközi együttműködéseink tehát összességében nemcsak szakmai, de jelentős anyagi haszonnal is jártak, és kivételnek tekinthetők a zöld biotechnológia területén a hazai technológiatranszfer kezdeményezések sorában.

A Hoechst céggel 1984-ben kötött kutatási szerződés egy másik területen is bejelentett szabadalomhoz vezetett: US 5,545,819; 1996; *Transgenic plants expressing a prokaryotic ammonium dependent asparagine synthetase*. Feltalálók: Dudits Dénes; Paulovics Katalin; Kálmán Katalin; Györgyey János; Nagy Ferenc; László Bakó; Horváth Gábor, Szeged; Peter Eckes, Kelkheim/Taunus; Günter Donn, Hofheim, Németország. Az ASN-A (E. C. 6.3.1.1) bakteriális aszparagin szintáz gént kifejező dohánynövények több előnyös tulajdonsággal rendelkeznek. Jobb a fotoszintetikus hatékonyságuk, a CO₂-megkötő képességük, gyorsabb a növekedési ütemük és fejlődésük, korábban virágoznak, nagyobb a zöldtömegük és a szárazsúlyuk. Mint a 7. ábra mutatja, az ASN-A fehérjét túltermelő dohánynövényeket kevésbé károsítja a glutamin szintáz enzimet gátló foszfinotricin (glüfozinát, PPT), és az ilyen kezelés stimulálja a transzformáns növények növekedését.

Koncz Csaba kezdeményezésére 1998 és 2000 között az SZBK-ban Szabados László csoportja működött együtt a *Vitality céggel (Izrael)* egy *Arabidopsis* T-DNS inszerciós mutánsgyűjtemény létrehozása érdekében. Ez a kutatóközösség a Bayer Crop Science cég számára is végzett kutatásokat.

1998-ban a belga Flanders Institute for Biotechnology (VIB) megalapította a *Crop Design* nevű biotechnológiai céget Gentben. Elsősorban a sejtosztódási ciklus kutatásában végzett SZBK-s munkák alapján a cég Tudományos Tanácsadó Testületébe felkérték Dudits Dénest, mert a cég indulásakor ez a terület állt a funkcionális genomikai projektek fókuszában. Egy évvel később kutatási-együttműködési megállapodás jött létre a Crop Design és az MTA SZBK között. A hároméves kollaboráció alatt a szegedi csoport különböző sejtbiológiai rendszerek felhasználásával géneket izolált lucernából és rizsből (pl. Domoki et al. 2006). Így vált később központi témává Szegeden a növényi retinoblasztóma homológok tanulmányozása (Lendvai et al. 2007; Ábrahám et al. 2011). A potenciális termésfokozó agronómiai gének azonosítása és funkcionális jellemzése érdekében a transzgenikus növényeket a Crop Design munkatársai állították elő és vizsgálták az ún. TraitMill technológiával, ami magába foglalja az üvegházi fenotipizálást is. A Szegeden izolált gének közül kettő esetében beigazolódott a termésmenvelő képesség, ezeket a géneket szabadalmaztatták (2. táblázat, EP 1580275B1 és EP 1732378B1). Fontos hozadéka volt ennek a kapcsolatrendszernek, hogy az SZBK csoport tagja lett egy jelentős uniós pályázatnak. A *European Cell Cycle Consortium* (ECCO: szerződésszám: QLG2-1999-00454) résztvevőjeként a szegedi kutatók elsősorban új F-boksz fehérjék vizsgálatát végezték. A tudományos hozadékon túl az EU-pályázat 250 ezer euró kutatási támogatást jelentett. A Crop Design 2006 óta a BASF Plant Science berkein belül működik eredményes biotechnológiai céggént.

A sikeres technológiatranszfer hazai történeteik közül mindenképpen kiemelt figyelmet érdemel a Hadlaczkó Gyula és munkatársai által kifejlesztett mesterséges kromoszóma technológia, illetve annak átvitele a növénynevelés világába. 1989-ben végezték azt a kísérletet, hogy centromer-specifikus DNS-sel transzformálták az emlős sejteket, aminek eredményeként új centromer épült fel, és minikromoszómák képződtek. A *szatellit alapú mesterséges kromoszómák (SATAC)* alkalmasak arra, hogy a centromerhez közeli régiókba tetszés szerinti gént lehessen beépíteni. Hadlaczkó Gyula írásából, amely a Magyar Tudomány 2013/5. számában jelent meg, megismerhetjük a technológia kifejlesztésének részletes történetét. Mint a hazai kutatások során oly gyakran, a pénztelenség okozta nehézségekre a megoldást a külföldi forrás jelentette. Szalai Aladár közvetítésével Kanadában megalakult a Chromos Molecular Systems Inc., a SATAC technológia biotechnológiai alkalmazására. A cég 2001-ben jelentette be, hogy a növényi mesterséges kromoszóma technológia kidolgozása érdekében létrehozta az Agrisoma Biosciences Inc.-t. Az anyagi támogatás mellett rendelkezésre bocsátotta a Chromos technológiák szabadalmait, többek között azokat is, amelynek feltalálói Hadlaczkó Gyula és munkatársai voltak. A szabadalmak felhasználásával az Agrisoma kidolgozta az *ETL (Engineered Trait Loci) technológiát*, amellyel kedvező zsírsav-összetételű repcét állított elő. Az egyszerűen telítetlen zsírsavtarta-

lom növelésével és a többszörösen telítetlen zsírsavak csökkentésével kedvezőbb tulajdonságú biodízel üzemanyag állítható elő. Bár áttételesen, mégis igen jelentős növényi biotechnológiai eredményhez vezetett Hadlaczky Gyula egyedülálló felfedezése. Mint az előzőekben tárgyalt példákhoz kapcsolódó közlemények szerzőlistái is bizonyítják, Hadlaczky Gyula sikeres és nélkülözhetetlen partnerként már a 70-es évektől részt vett a növényi biotechnológiai kutatásokban. Rendkívüli személyisége, a kutatás szenvedélyétől fűtött hatalmas munkabírása példa volt mindannyiunk számára, ezért is jelentett pótolhatatlan veszteséget 2013-ban váratlan, korai halála.

Milyen jövő vár a magyar zöld agrár-biotechnológiára?

A fentiekben bemutatott eredmények láttán még a legrosszabb szándékú értékelésnek is el kell ismernie, hogy a magyar növényi biotechnológia figyelemre méltó, sikeres múlttal rendelkezik, és az országban több nemzetközi ismertséggel rendelkező iskola működik. A jövő kilátásait differenciáltan kell prognosztizálnunk. A mikroszaporító üzemek gazdaságos működtetését a betegségmentes szaporítóanyagok iránti kereslet alapvetően meghatározza majd. A technológiák automatizálása jelentősen növelheti a tevékenység nyereségességét. A zöldenergia-igények megsokszorozódásával előtérbe kerülhetnek a bioenergia hasznosítású fajok szaporítási technológiái. Az *Arundo* növények szaporításában elért debreceni eredmények, az exporttevékenység biztató példát nyújtanak arra, hogy van jövője ennek a biotechnológiai iparnak Magyarországon.

Az Erekly-féle definícióból is következik, hogy a biotechnológia elválaszthatatlan, integráns részévé vált a növény-nemesítésnek. Ezt számos hazai példa igazolja, akár a búza, a kukorica, a burgonya, a paprika vagy a szőlő nemesítési programjait nézzük. A molekuláris markereket rutinszerűen használják, és egyre inkább a DNS-szekvenencia alapú módszerek kerülnek előtérbe. Ezen a területen a magyar kutatók újdonság értékű fejlesztésekkel is jelentkezhettek, mint például híres magyar fajták DNS-szekvenálásával. Hasonlóképp, több gazdasági növényünknel ma már a haploidok előállítása is kikerülhetetlen eleme a fajta-előállító munkának. Fontos, hogy a növényi őssejtállapot, a totipotencia biológiai alapjainak a kutatása folytatódjék, mert ezen keresztül lehet a növényregenerációs folyamatokat úgy irányítani, hogy a nemesítési tenyészcsoportok széles választéka, genotípustól függetlenül alkalmas legyen a technológia alkalmazására.

Ma Magyarországon a géntechnológiával történő nemesítés jövője rövid távon igen sok bizonytalansággal terhelt. Az egyik járható út, hogy olyan technológiák kifejlesztése és alkalmazása kerül előtérbe, amelyek terméke a jelenlegi EU-szabályozás szerint nem tekintendő GMO-nak, és így nem esne a költséges GMO-szabályozás érvénye alá. Számos növény nemesítése során beigazolódott, hogy a *kromoszómakészlet megsokszorozása*, az autopoliploidok előállítása lehetőséget nyújt a biológiai teljesítmény fokozására. Különösen használható ez a megközelítés a vegetatív úton szaporított energianövények esetében. Ezt kívánták kihasználni az SZBK kutatói, amikor

előállították az energiafűz poliploid változatát. A $2n=76$ kromoszómával rendelkező *Salix viminalis* L. növények szabadföldi értékelése ad majd választ arra, hogy a kromoszómaszám megduplázása milyen hatást gyakorol a növekedési intenzitásra, a biomasszahozam alakulására. A poliploidizáció iránti figyelem fokozódása abban is tetten érhető, hogy külföldön több vállalkozás is alakult a metodikai újdonságok alkalmazására. Egy ausztrál cég például epigenetikus úton állít elő tetszés szerinti poliploid növényeket.

Külön figyelmet érdemelnek az „Új nemesítési módszerek”, amelyekről a European Commission's Joint Research Centre (JRC) Institute részletes tanulmányt készített *New plant breeding techniques: state-of-the-art and prospects for commercial development* címmel (2011). Gyakran hangoztatott kritika a GM-növények ellenzői részéről, hogy mivel nem tudjuk irányítani, hogy a genom mely részébe épüljön be az idegen transzgen, ezért ezek a növények „félkész termékek”. Nem mintha a nemesítő keresztezés-kor kontrollálni tudná a gének keveredését, mégis elvárják, hogy az irányíthatóság követelmény legyen a géntechnológiával folytatott nemesítés során. A JRC tanulmány két módszert is bemutat, amely lehetővé teszi a helyspecifikus génbeépítést. A *cink-ujj nukleáz* módszert és az *oligonukleotidok által irányított génspecifikus mutáció* (ODM: oligonucleotide directed mutagenesis) létrehozásának technológiáját Dudits és Györgyey (2013) ismerteti a korábban idézett *Zöld GMO-k* című könyvében. Az ODM témában a jelenlegi eljárások legfőbb hiányossága, hogy alacsony a mutációk gyakorisága, és korlátozott azoknak az agronómiai tulajdonságoknak a köre, amelyek esetében szelektív módszer alkalmazható a mutáns sejtek, növények felismerésére. A szintetikus oligonukleotidok által indukált génspecifikus mutációk számának növelését várhatjuk az oligonukleotidok kémiai szerkezetének optimalizálásától, a molekulák sejtekbe történő bejuttatásának hatékonyabbá tételétől. A mutációk homológ rekombinációval a DNS replikációja alatt következhetnek be, ezért szinkronizált sejtek használatával, illetve a kromatin szerkezetének módosításával érhető el a hatékonyság növelése. Az SZBK Növénybiológiai Intézetében folyamatban van ezeknek a tényezőknek a vizsgálata.

Nehéz vitatni, hogy a zöld biotechnológia frontvonalát a genomok szerkesztésének különböző módzatai jelentik. A bemutatott visszatekintés igazolja azt a tendenciát, hogy a beavatkozások precizitása javult a legutóbbi évtizedekben végzett kutatások eredményeképpen. A szomatikus hibridizáció is folyamatosan fejlődött a cibridizáció és aszimmetrikus hibridizáció felé. Ezek a módszerek azonban veszítettek jelentőségükből, ami érthető, hiszen a jövő kétségtelenül az izolált gének beépítésére alapozott génnemesítésé, a GM-növények előállításáé. Ez olyan innovációs világtendencia, amelyet megkérdőjelezni csak nagy károkozás árán és ideig-óráig lehet. Magyarországon a GMO-mentes növénytermesztést meghirdető politika talaját veszti, ha az EU olyan GM-növények termesztését is engedélyezi, amelyek jelentős gazdaságosságai és környezetvédelmi hasznot jelentenek a magyar gazdák számára. Így a kukoricabogár-ellenálló vagy aszálytűrő kukorica hibridek, illetve a burgonyavész-rezisztens fajták természetességén nehéz lesz meggyőzni a gazdálkodókat, hogy ilyen

„félkész termékekre” nincs szükségük, miközben a szomszédos országokban a versenytársak kihasználják a GM-fajták előnyeit.

Az agrár géntechnológia magyarországi jövőjét csak úgy lehet biztosítani, ha aktív ismeretterjesztés segíti a technológia tudományos lényegének bemutatását. A jelenleg tapasztalható társadalmi elutasításért sokban felelős a média, különösen az írott sajtó, hisz a hírek széles teret engednek a tudománytalan szenzációknak, és GMO-kkal riogatják az embereket. Sajnos csak kevés kutató vállal szerepet a korrekt tájékoztatásban, pedig ez a közösség könnyen áldozata lehet a fékevesztett GMO-ellenességnek, még ha az átmeneti is. Az 1999-ben alapított *Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület (BZBE)* a legmarkánsabb arculatú hazai szervezet, amely folyamatosan el- lentsúlyozni igyekszik a közvélemény, a politikai döntéshozók félretájékoztatásából fakadó torzulásokat. A konferenciák szervezésén túl az Egyesület állandó kiadványa a *Zöld Biotechnológia Hírlevél* (<http://www.zoldbiotech.hu>). Folyamatosan támogatja tudományos és ismeretterjesztő kiadványok megjelentetését is. A BZBE fontos együttműködő partnerének tekinti a *Pannon Növény-Biotechnológiai Egyesületet*, amelynek tevékenységi köre kiterjed a Kárpát-medence országaira. Legfontosabb közös kiadványuk a *Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében: Magyar Fehér Könyv* (2011) magyar és angol nyelvű kiadása.

Felhasznált irodalom

- Ábrahám, E.–Miskolczi, P.–Ayaydin, F.–Yu, P.–Kotogány, E.–Bakó, L.–Ötvös, K.–Horváth, G. V.–Dudits, D. (2011) Immunodetection of retinoblastoma-related protein and its phosphorylated form in interphase and mitotic alfalfa cells. *J Exp Bot* 62: 2155–2168.
- Ambrus, H.–Darkó, É.–Szabó, L.–Bakos, F.–Király, Z.–Barnabás, B. (2006) *In vitro* microspore selection in maize anther culture with oxidative-stress stimulators. *Protoplasma* 228: 87–94.
- Bakos, F.–Darkó, É.–Pónya, Z.–Barnabás, B. (2003) Regeneration of fertile wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from isolated zygotes using wheat microspore culture as nurse cells. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 74: 243–247.
- Bakos, F.–Jäger, K.–Barnabás, B. (2005) Regeneration of haploid plants after distant pollination of wheat via zygote rescue. *Acta Biologica Cracoviensis Series Botanica* 47: 167–171.
- Bakos F. (2007) *In vitro* embriófejlődés a gabonafélék gametofitikus sejtvonalaiból. PhD-értekezés, ELTE, Budapest.
- Bárány, I.–Testillano, P. S.–Mitykó, J.–Risueno, M. C. (2001) The switch of the microspore program in *Capsicum* involves HSP70 expression and leads to the production of haploid plants. *International J Dev Biol* 45: 39–40.
- Barnabás, B. (2003) Anther culture of maize (*Zea mays* L.) In: Maluszinsky, M.–Kasha, K. J.–Foster, B. P.–Szarejko, I. (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants. A Manual*. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, 103–108.
- Barnabás, B.–Fransz, P. F.–Schel, J. H. (1987) Ultrastructural studies on pollen embryogenesis in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Rep* 6: 212–215.

- Barnabás, B.–Obert, B.–Kovács, G. (1999) Colchicine, an efficient genome-doubling agent for maize (*Zea mays* L.) microspores cultured *in anthero*. *Plant Cell Rep* 18: 858–862.
- Barnabás, B.–Spitkó, T.–Jäger, K.–Pintér, J.–Marton, L. C. (2005) Strategy for improvement of doubled haploid production in maize. *Acta Agron Hung* 53: 177–182.
- Bedő, Z.–Karsai, I.–Juhász, A.–Szűcs, P.–Mészáros, K.–Hayes, P. M.–Láng, L. (1999) Contribution of biotechnological methods to the cereal breeding. *J Plant Biotech* 1: 39–45.
- Bisztray Gy.–Velich I. (1999) Molekuláris markerezési eljárások kertészeti növényeknél. In: Novák M. H. (szerk.) *Genetikai variabilitás a növénynevelésben*. Mezőgazda, Budapest, 61–65.
- Błaszczuk, L.–Chełkowski, J.–Korzun, V.–Kraic, J.–Ordon, F.–Ovesná, J.–Purnhauser, L.–Tar, M.–Vida, G. (2004) Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories. *Cell Mol Biol Lett* 9: 805–817.
- Bögge, L.–Stefanov, I.–Ábrahám, M.–Somogyi, I.–Dudits, D. (1990) Differences in the responses to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) treatment between embryogenic and non-embryogenic lines of alfalfa. In: Nijkamp, H. J. J.–van der Plaas, L. H. W.–Van Aartrijk, J. (eds) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 427–436.
- Brookes, G.–Barfoot, P. (2012a) Global Impact of Biotech Crops: Environmental Effects, 1996–2010 *GM Crops* 3(2): 1–9. <http://www.landesbioscience.com/journals/36/article/20061/>.
- Brookes, G.–Barfoot, P. (2012b) The income and production effects of biotech crops globally 1996–2010 *GM Crops* 3(4): 265–272. <http://www.landesbioscience.com/journals/36/article/20097/>.
- Cernák, I.–Taller, J.–Wolf, I.–Fehér, E.–Babinszky, G.–Alföldi, Z.–Csanádi, G.–Polgár, Z. (2008) Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene Rysto, and the identification of new markers. *Acta Biol Hung* 59: 195–203.
- Cseri, A.–Sass, L.–Törjék, O.–Pauk, J.–Vass, I.–Dudits, D. (2013) Monitoring drought responses of barley genotypes with semi-robotic phenotyping platform and association analysis between recorded traits and allelic variants of some stress genes. *J. Aus Crop Sci* 7: 1560–1570.
- Deák T. (2010) Molekuláris markerek alkalmazása a szőlő magvatlanságának követésére és Rosa l. taxonok rokonsági viszonyainak vizsgálatára. PhD-értekezés, Budapesti Corvinus Egyetem, Szőlészeti és Borászati Intézet, Szőlészeti Tanszék.
- Deák, M.–Donn, G.–Fehér, A.–Dudits, D. (1988) Dominant expression of a gene amplification-related herbicide resistance in medicago cell hybrids. *Plant Cell Rep* 7: 158–161.
- Dobránszki, J.–Jámbor-Benczúr, E.–Reményi, M. L.–Magyar-Tábori, K.–Hudák, I.–Kiss, E.–Galli, Z. (2005) Effects of aromatic cytokinins on structural characteristics of leaves and their post-effects on subsequent shoot regeneration from *in vitro* apple leaves of 'Royal Gala'. *International J of Hort Sci* 11: 41–46.
- Dobránszki, J.–Hudák, I.–Magyar-Tábori, K. (2008) Relationship between microtuber yield and the rate of perimedulla under different tuberization conditions. In: Chiru, S.–Oltenu, G.–Aldea, C.–Bădărău, C. (eds) *Potato for a Changing World. Abstracts of 17th Triennial*

- Conference of the European Association for Potato Research, 2008, July 06–10, Brasov Romania. Brasov, 566–569.*
- Domoki, M.–Györgyey, J.–Bíró, J.–Pasternak, T. P.–Zvara, A.–Bottka, S.–Puskás, L. G.–Dudits, D.–Fehér, A. (2006) Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf-protoplast-derived alfalfa cells. *Biochim Biophys Acta* 1759: 543–551.
- Dudits D. (1982) *Fuzionált sejtek, hibrid növények*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Dudits D. (1999) A sejtosztódás, differenciálódás és az egyedfejlődési program szabályozásának molekuláris alapjai. In: Balázs E.–Dudits D. (szerk.) *Molekuláris növénybiológia*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 249–298.
- Dudits D. (2009) Génműveltség és a modern növényfajták születése. In: Dudits D. (szerk.) *Zöld géntechnológia és agrárinnováció*. Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület, Szeged, 11–100.
- Dudits, D.–Ábrahám, E.–Miskolczi, P.–Ayaydin, F.–Bilgin, M.–Horváth, G. V. (2011) Cell-cycle control as a target for calcium, hormonal and developmental signals: the role of phosphorylation in the retinoblastoma-centred pathway. *Ann Bot* 107: 1193–1202.
- Dudits, D.–Bögre, L.–Györgyey, J. (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. *J Cell Sci* 99: 475–484.
- Dudits, D.–Györgyey, J.–Bögre, L.–Bakó, L. (1995) Molecular biology of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T. A. (ed.) *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 267–308.
- Dudits D.–Györgyey J. (2013) *Zöld GMO-k*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Dudits, D.–Hadlaczky, G.–Lévi, E.–Fejér, O.–Haydu, Z.–Lázár, G. (1977) Somatic hybridisation of *Daucus carota* and *D. capillifolius* by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 51: 127–132.
- Dudits, D.–Hadlaczky, Gy.–Lázár, G.–Haydu, Zs. (1980) Increase in genetic variability through somatic cell hybridization of distantly related plant species. In: Sala, F. et al. (eds) *Plant Cell Culture: Results and Perspectives*. Elsevier–North Holland, Amsterdam, 207–214.
- Dudits D.–Heszky L. (2000) Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform, Budapest.
- Dudits, D.–Kao, K. N.–Constabel, F.–Gamborg, O. L. (1976) Embryogenesis and formation of tetraploid and hexaploid plants from carrot protoplasts. *Can J Bot* 54: 1063–1067.
- Dudits, D.–Maroy, E.–Praznovszky, T.–Oláh, Z.–Györgyey, J.–Cella, R. (1987) Transfer of resistance traits from carrot into tobacco by asymmetric somatic hybridization: Regeneration of fertile plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8434–8438.
- Dudits, D.–Németh, G.–Haydu, Z. (1975) Study of callus growth and organ formation in wheat (*Triticum aestivum* L.) tissue cultures. *Can J Bot* 53: 957–963.
- Endre, G.–Kaló, P.–Kevei, Z.–Kiss, P.–Mihacea, S.–Szakál, B.–Kereszt, A.–Kiss, G. B. (2002a) Genetic mapping of the non-nodulation phenotype of the mutant MN-1008 in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Mol Genet Genomics* 266: 1012–1019.
- Endre, G.–Kereszt, A.–Kevei, Z.–Mihacea, S.–Kaló, P.–Kiss, G. B. (2002b) A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* 417: 962–966.
- Fehér, A.–Preiszner, J.–Dudits, D. (1989) Differentiation of potato (*Solanum tuberosum* L.) plants from cultured leaf protoplasts. *Acta Biol Hung* 40: 369–380.

- Fehér, A.–Preisznér, J.–Litkey, Z.–Csanádi, G.–Dudits, D. (1992) Characterization of chromosome instability in interspecific somatic hybrids obtained by X-ray fusion between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Theor Appl Genet* 84: 880–890.
- Fehér, A.–Pasternak, T. P.–Dudits, D. (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 74: 201–228.
- Felföldi, K.–Purnhauser, L. (1992) Induction of regenerating callus from immature embryos of 44 wheat and 3 Triticale cultivars. *Cer Res Comm* 20: 273–277.
- Galbács, Z.–Molnár, S.–Halász, G.–Kozma, P.–Hoffmann, S.–Kovács, L.–Veres, A.–Galli, Z.–Szóke, A.–Heszky, L.–Kiss, E. (2009) Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. *Vitis* 48: 17–24.
- Galiba, G.–Tóth, B. (2006) A búzagének térképezése: molekuláris markerek és kvantitatív tulajdonságokért felelős kromoszómaregiók (QTLs). In: Dudits D. (szerk.) A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig. MTA Szegedi Biológiai Központ–Winter Fair Kft., Szeged, 44–56.
- Györgyey, J.–Gartner, A.–Németh, K.–Magyar, Z.–Hirt, H.–Heberle-Bors, E.–Dudits, D. (1991) Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol* 16: 999–1007.
- Gyulai, G.–Kiss, E.–Csillag, A.–Heszky, L. E. (1993) Developmental analysis of primary and secondary somatic embryogenesis in soybean tissue culture. *Acta Biol Hung* 44: 189–196.
- Hadlaczy, G.–Bisztray, G.–Praznovszky, T.–Dudits, D. (1983) Mass isolation of plant chromosomes and nuclei. *Planta* 157: 278–285.
- Hetényi K. (2011) Az Alaptörvény GMO-mentességről szóló rendelkezésének értelmezése az európai jog tükrében. Szakvélemény. *Zöld Biotechnológia Hírlevél* 2011/9. (<http://www.zoldbiotech.hu/articles/2012-06/47/1109.pdf>).
- Heszky L. (1974) A *Nicotiana tabacum* L. haploid és homozigóta diploid alakjainak előállítása portokkultúrában, valamint kalluszsövet-kultúrában. *Agrobotanika* 15: 215–232.
- Heszky L.–Li, S. N.–Kiss, E.–Simon-Kiss, I.–Lőkös, K.–Do, Q. B. (1991) *In vitro* production of rice in Hungary. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 6. Rice. Springer, Berlin–Heidelberg–NewYork, 619–641.
- Heszky L.–Pauk J. (1976) Haploid növények előállítása az *Oryza sativa* L. *in vitro* portok és ováriumkultúrájából. II. Növényindukció portokkultúrában. *Agrobotanika* 16: 147–153.
- Heszky, L.–Simon-Kiss, I.–Do, Q. B. (1996) Release of rice variety “DAMA” developed through haploid somaclone breeding. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 36. *Somaclonal Variation in Crop Improvement II*. Springer, Berlin–Heidelberg–NewYork, 45–54.
- Hirt, H.–Mink, M.–Pfosser, M.–Bögre, L.–Györgyey, J.–Jonak, C.–Gartner, A.–Dudits, D.–Heberle-Bors, E. (1992) Alfalfa cyclins: differential expression during the cell cycle and in plant organs. *Plant Cell* 4: 1531–1538. Erratum in: *Plant Cell* 1993/5: 715.
- Hirt, H.–Páy, A.–Györgyey, J.–Bakó, L.–Németh, K.–Bögre, L.–Schweyen, R. J.–Heberle-Bors, E.–Dudits, D. (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1636–1640.
- Jafari, M. A.–Kiss, J.–Gergác, J.–Heszky, L. E. (1995) High efficiency callus induction and plant regeneration in petiole culture of four poplar genotypes. *Acta Biol Hung* 46: 51–59.

- Jámborné Benczúr E.–Dobránszki, J. (2005) *Kertészeti növények mikroszaporítása*. Mezőgazda, Budapest.
- Jámborné Benczúr, E.–Kálmánné, M. (1990) *In vitro* propagation of *Philodendron tuxlanum* bunting with BA. *Acta Agronom* 39: 341–348.
- Kállai, M.–Csitári, G.–Polgár, Z. (2006) Possibility of the use of *Solanum brevides* based soft rot resistance in potato breeding. *Commun Agric Appl Biol Sci* 71: 1049–54.
- Kiss, G. B.–Csanádi, G.–Kálmán, K.–Kaló, P.–Ökrész, L. (1993) Construction of a basic genetic map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol Gen Genet* 238: 129–37.
- Kiss G. B.–Endre G. (1999) Molekuláris markerek alkalmazása a növénygenetikában. In: Balázs E.–Dudits D. (szerk.) *Molekuláris növénybiológia*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 37–90.
- Kovács, M.–Barnabás, B.–Kranz, E. (1994) The isolation of viable egg cells of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sex Plant Repr* 7: 311–312.
- Kovács, M.–Barnabás, B.–Kranz, E. (1995) Electro-fused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. *Plant Cell Rep* 15: 178–180.
- Lendvai, Á.–Pettkő-Szandtner, A.–Csordás-Tóth, É.–Miskolczi, P.–Horváth, G. V.–Györgyey, J.–Dudits, D. (2007) Dicot and monocot plants differ in retinoblastoma-related protein subfamilies. *J Exp Bot* 58: 1663–1675.
- Lőkös Tóth, K.–Mázik Tókei, K.–Kertész, Z.–Pauk, J.–Heszky, L. E. (1997) Agronomic performance of doubled haploid wheat varieties. *Cer Res Comm* 25: 155–161.
- Maliga, P.–Sz. Breznovits, A.–Márton, L. (1973) Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco. *Nature New Biol* 244: 29–30.
- Maliga, P.–Sz. Breznovits, A.–Márton, L.–Joó, F. (1975) Non-Mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria. *Nature* 255: 401–402.
- Márton, L.–Biasini, G.–Maliga, P. (1985) Co-segregation of nitrate-reductase activity and normal regeneration ability in selfed sibs of *Nicotiana plumbaginifolia* somatic hybrids, heterozygotes for nitrate-reductase deficiency. *Theor Appl Genet* 70: 340–344.
- Medgyesy, P.–Fejes, E.–Maliga, P. (1985) Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6960–6964.
- Menczel, L.–Galiba, G.–Nagy, F.–Maliga, P. (1982) Effect of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in *Nicotiana*. *Genetics* 100: 487–495.
- Menczel, L.–Nagy, F.–Kiss, Z. R.–Maliga, P. (1981) Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana glauca*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids. *Theor Appl Gen* 59: 191–195.
- Mesterházy, Á. (2006) A kalászfuzárium-rezisztens fajták jelentősége az egészségkímélő élelmiszerek megtermelésében. In: Dudits D. (szerk.) *A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig*. MTA Szegedi Biológiai Központ–Winter Fair Kft., Szeged, 259–283.
- Mészáros, A.–Kálai, K.–Domonkos-Szabolcsy, É.–Fári, M. G.–Halász, K. (2006) An efficient micropropagation system: 3R Bioreactor. *Acta Horticulturae* 725: 621–624.
- Mitykó, J.–Andrásfalvy, A.–Csilléry, G.–Fáry, M. (1995) Anther-culture response in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant Breed* 114: 78–80.

- Molnár, I.–Kubaláková, M.–Šimková, H.–Cseh, A.–Molnár-Láng, M.–Doležel, J. (2011) Chromosome isolation by flow sorting in *Aegilops umbellulata* and *Ae. comosa* and their allotetraploid hybrids *Ae. biuncialis* and *Ae. geniculata*. *PLoS One* 6: e27708.
- Monostori, T.–Lantos, Cs.–Mihály, R.–Pauk, J. (2003) Induction of embryogenesis without exogenous hormone-supplement in barley microspore culture. *Cer Res Comm* 31: 297–300.
- Mórocz, S.–Donn, G.–Németh, J.–Dudits, D. (1990) An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. *Theor Appl Genet* 80: 721–726.
- Nagy, F.–Lázár, G.–Menczel, L.–Maliga, P. (1983) A heteroplasmic state induced by protoplast fusion is a necessary condition for detecting rearrangements in *Nicotiana* mitochondrial DNA. *Theor Appl Genet* 66: 203–207.
- Omirulleh, S.–Ábrahám, M.–Golovkin, M.–Stefanov, I.–Karabaev, M.–Mustárdy, L.–Mórocz, S.–Dudits, D. (1993) Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize. *Plant Mol Biol* 21: 415–428.
- Ötvös, K.–Pasternak, T. P.–Miskolczi, P.–Domoki, M.–Dorjgotov, D.–Szucs, A.–Bottka, S.–Dudits, D.–Fehér, A. (2005) Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *Plant J* 43: 849–860.
- Pasternak, T.–Miskolczi, P.–Ayaydin, F.–Mészáros, T.–Dudits, D.–Fehér, A. (2000) Exogenous auxin and cytokinin dependent activation of CDKs and cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Growth Regul* 32: 129–141.
- Pauk, J.–Kertész, Z.–Barabás, Z. (1988) Production of wheat lines by means of anther culture and their performance in performance tests.; *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Növénytermelés* 37: 197–203.
- Pauk, J.–Kertész, Z.–Beke, B.–Bóna, L.–Csósz, M.–Matúz, J. (1995) New winter wheat variety: 'GK Délibáb' developed via combining conventional breeding and *in vitro* androgenesis. *Cer Res Comm* 23: 251–256.
- Pocza, P.–Cernák, I.–Gorji, A. M.–Nagy, S.–Taller, J.–Polgár, Z. (2010) Development of intron targeting (IT) markers for potato and cross-species amplification in *Solanum nigrum* (Solanaceae). *Am J Bot* 97: e142–145.
- Polgár, Z.–Preisznér, J.–Dudits, D.–Fehér, A. (1993) Vigorous growth of fusion products allows highly efficient selection of interspecific potato somatic hybrids: molecular proofs. *Plant Cell Rep* 12: 399–402.
- Pónya, Z.–Finy, P.–Fehér, A.–Mitykó, J.–Dudits, D.–Barnabás, B. (1999) Optimisation of introducing foreign genes into egg cells and zygotes of wheat (*Triticum aestivum* L.) via microinjection. *Protoplasma* 208: 163–172.
- Popp J.–Potori N. (2011) A GM-növények gazdasági hatásainak áttekintése. In: Balázs E.–Dudits D.–Sági L. (szerk.) *Genetikailag módosított élőlények (GMO-k) a tények tükrében. Magyar Fehér Könyv*. Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület, Szeged, 89–95.

- Preisner, J.–Fehér, A.–Veisz, O.–Sutka, J.–Dudits, D. (1991) Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum* L.) and *S. brevidens* Phil. *Euphytica* 57: 37–49.
- Purnhauser L. (2006) Molekuláris markerek a rezisztenciagének nyomon követéséhez. In: Dudits D. (szerk.) A búza nemesítésének tudománya. A funkcionális genomikától a vetőmagig. MTA Szegedi Biológiai Központ–Winter Fair Kft., Szeged, 289–299.
- Purnhauser, L.–Bóna, L.–Láng, L. (2011a) Identification of Sr31 and Sr36 stem rust resistance genes in wheat cultivars registered in Hungary. *Cer Res Comm* 39: 53–66.
- Purnhauser, L.–Bóna, L.–Láng, L. (2011b) Occurrence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation and of Sr36/Pm6 resistance gene cluster in wheat cultivars registered in Hungary. *Euphytica* 179: 287–295.
- Purnhauser, L.–Medgyesy, P.–Czakó, M.–Dix, P. J.–Márton, L. (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep* 6: 1–4.
- Sági, L.–Barnabás, B. (1989) Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 78: 867–872.
- Sidorov, V. A.–Menczel, L.–Nagy, F.–Maliga, P. (1981) Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. *Planta* 152: 341–345.
- Spitkó, T.–Sági, L.–Pintér, J.–Marton, L. C.–Barnabás, B. (2006) Haploid regeneration aptitude of maize (*Zea mays* L.) lines of various origin and of their hybrids. *Maydica* 51: 537–542.
- Szabados, L.–Dudits, D. (1980) Fusion between interphase and mitotic plant protoplasts. Induction of premature chromosome condensation. *Exp Cell Res* 127: 442–446.
- Szabados, L.–Hadlaczky, G.–Dudits, D. (1981) Uptake of isolated plant chromosomes by plant protoplasts. *Planta* 151: 141–145.
- Szakács, E.–Kovács, G.–Pauk, J.–Barnabás, B. (1988) Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* 7: 127–129.
- Szarka, B.–Dévényi, M.–Mórocz, S. (2001) Fertile maize lines obtained from isolated microspores. *Euphytica* 122: 53–60.
- Szarka, B.–Göntér, I.–Molnár-Láng, M.–Mórocz, S.–Dudits, D. (2002) Mixing of maize and wheat genomic DNA by somatic hybridization in regenerated sterile maize plants. *Theor Appl Genet* 105: 1–7.
- Su, Y. H.–Zhao, X. Y.–Liu, Y. B.–Zhang, C. L.–O'Neill, S. D.–Zhang, X. S. (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 448–460.
- Tantos, Á.–Mészáros, A.–Farkas, T.–Szalai, J.–Horváth, G. (2001) Triacantanol supported micropropagation of woody plants. *Plant Cell Rep* 20: 16–21.
- Tar, M.–Purnhauser, L.–Csisz, M. (2008) Identification and localization of molecular markers linked to the Lr52 leaf rust resistance gene of wheat. *Cer Res Comm* 36: 409–415.

- Toldi, O.–Gyulai, G.–Kiss, J.–Tamás, I. A.–Balázs, E. (1996) Antiauxin enhanced microshoot initiation and plant regeneration from epicotyl-originated thin-layer explants of sugarbeet (*Beta vulgaris L.*). *Plant Cell Rep* 15: 851–854.
- Törjék, O.–Kiss, E.–Kiss, J.–Kondrák, M.–Gyulai, G.–Gergác, J.–Heszky, L. (2001) Evaluation of genetic diversity of poplar genotypes by RAPD and AP-PCR analysis. *Acta Biol Hung* 52: 345–354.
- Vida, G.–Gál, M.–Uhrin, A.–Veisz, O.–Syed, N. H.–Flavell, A. J.–Wang, Z.–Bedó, Z. (2009) Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance. *Euphytica* 170: 67–76.
- Wang, Z. L.–Láng, L.–Uhrin, A.–Veisz, O.–Liu, S. D.–Vida, G. (2009) Identification of the Lr34/Yr18 rust resistance gene region in a Hungarian wheat breeding programme. *Cer Res Comm* 37: 431–440.

A kötet szerzői

Dudits Dénes

akadémikus, kutatóprofesszor

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet

6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

1943-ban született, a Gödöllői Agrártudományi Egyetem (GATE) Mezőgazdasági Karán 1966-ban szerzett kitüntetéses agrármérnöki diplomát. 1971-től az MTA Szegedi Biológiai Központ kutatójaként kezdetben búza szövettenyésztési és szomatikus sejthibridizációs témákon dolgozott. 1982–83-ban a Massachusetts General Hospital Molekuláris Biológiai Osztályán, Bostonban és a Harvard Egyetem Orvosi Karán, (Cambridge, Massachusetts, USA) vendégprofesszorként végzett kutatásokat, ahol a rekombináns DNS módszereket sajátította el. Hazatéréseével kiszélesedett Magyarországon a növényi génebézészet, amelyet korábban Koncz Csabával kezdeményeztek a hímsteril kukorica mitokondriális plazmidja DNS-ének jellemzésével. Az első magyarországi transzgenikus (GM) növényt 1986-ban megjelent közleményükben írták le. Mórocz Sándorral, a szegedi Gabonakutató Intézet kukoricanemesítőjével egy világszabadalommal védett génbeépítési technológiát dolgoztak ki, amellyel gyomirtószer-ellenálló növények előállítására történt. Nemzetközileg is elismert kutatásokat végzett a növényi sejtek osztódását szabályzó gének és fehérjekomplexek jellemzésével. Közel egy évtizeden át koordinátorként vezette azt a Búzakonzorciumot, amely integrálta a hazai nemesítési és alapkutatói tevékenységeket. Jelenlegi kutatásainak középpontjában a szárazságtűrés genetikai és élettani alapjainak megismerése áll. Együttműködésben Pauk Jánossal, a Gabonakutató Intézet munkatársával egy lucerna méregtelenítő gén beépítésével új, szárazságtűrő búza genotípusokat állítottak elő.

Széchenyi-díjas akadémikus, jelenleg a Magyar Tudományos Akadémia élettudományi alelnöke. Ezen kívül tagja az Academia Europaea-nak és az Európai Molekuláris Biológiai Szervezetnek (EMBO), valamint éveken keresztül vezetőségi tagja volt a Nemzetközi Sejtkutató Szervezetnek (ICRO) és az Európai Növénytudományi Szervezetnek (EPSO). A Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület alapító elnökeként aktív szerepet vállal a géntechnológiával történő növénynevelés hazai elfogadtatásában.

Fehér Attila

tudományos tanácsadó

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet
6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

Egyetemi tanulmányainak befejezése (biológus szak, Kossuth Lajos Tudományegyetem, Debrecen) után 1984-ben került az MTA SZBK Dudits Dénes vezette kutatócsoportjába. 1993-ban védte meg *in vitro* génátviteli módszerek burgonyanemesítésben történő alkalmazásával kapcsolatos kandidátusi disszertációját, majd nemzetközi posztdoktorális ösztöndíjakkal köszönhetően közel három évig dolgozott a franciaországi tudományos akadémia növénybiológiai intézetében (CNRS, Institut des Sciences du Végétal, Gif-sur-Yvette). Hazatérése után, Dudits Dénes főigazgatói kinevezése miatt, átvette a „Növényi Sejtosztódás és Differenciálódás” csoport operatív irányítását. 2003-ban az MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében megalapíthatta saját, „Funkcionális Sejtbiológia” elnevezésű kutatócsoportját, melynek érdeklődési körében a növényi egyedfejlődés és morfogenezis rugalmasságának szabályozása áll. Ezzel kapcsolatos, a testi sejtekből elinduló embriófejlődés (szomatikus embriogenezis) körülményeit feltáró kutatásai szolgáltak akadémiai doktori értekezésének alapjául, melyet 2008-ban védett meg. Jelenlegi kutatásai a növényi RHO-típusú GTPázokhoz kapcsolódó jelátviteli utak feltárására és a növényi embriogén sejtek („össejtek”) *in vitro* indukciójával kapcsolatos epigenetikai változások megismerésére irányulnak.

Horváth V. Gábor

tudományos főmunkatárs

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet
6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A Szegedi Biológiai Kutatóközpontban 1989-ben kezdett a rekombináns kloroplasztisz genommal kapcsolatos kutatásaiba, amivel 1995-ben szerezte meg egyetemi doktori (Dr. Univ.) fokozatát. Ugyanebben az évben csatlakozott a Dudits Dénes által vezetett csoporthoz, ahol egyik feladata a növényi sejtciklus szabályozófehérjéi között fellépő kölcsönhatások vizsgálata volt. Ezzel párhuzamosan bekapcsolódott a Bay Zoltán Alkalmazott Biotechnológiai Intézettel közösen folytatott, a fokozottan stressztűrő haszonnövények előállítását célul tűző kutatásokba, melyek később az ő irányításával folytak. 1998-ban szerezte meg PhD fokozatát a fehérje-fehérje kölcsönhatások élesztő kettős hibrid rendszerben történő vizsgálatának elemzésével, majd 2000 és 2003 között a *Medicago truncatula* gümősejtekben végbemenő endoreduplikációt szabályozó fehérjét vizsgálta Gif-sur-Yvette-ben (Franciaország) Kondorosi Éva irányításával. Innen hazatérve ismét bekapcsolódott a növényi sejtciklussal és a stressztűrő növényekkel kapcsolatos munkákba, 2005 és 2013 között ő vezette az ehhez kapcsolódó kutatásokkal foglalkozó Növényi Sejtosztódási és Stressz Adaptációs Csoportot. Jelenleg fő kutatási témája a növényi sejtciklus fényregulációja, de aktívan részt vesz az aldo-keto redukázok agrár-biotechnológiai alkalmazását célzó munkákban is.

Koncz Csaba

kutatócsoport-vezető

Max Planck Institut Für Pflanzenzüchtungsforschung
Carl-von-Linné-Weg 10, D-50829 Köln, Németország

1977-ben végzett biológusként a szegedi József Attila Tudományegyetemen. Diploma- (1977) és egyetemi doktori (1978) dolgozatát az MTA Szegedi Biológiai Központjában készítette Venetianer Pál szakmai irányítása alatt. 1977-től 1987-ig Dudits Dénes csoportjában dolgozott az SZBK Genetikai, majd Növénybiológiai Intézetében. 1979-ben egy hónapos tanulmányúton volt Jeff Schell és Marc Van Montagu genti intézetében, majd 1980–81 között a kölni Max Planck Intézetben dolgozott ösztöndíjasként. Kutatásait Szegeden folytatta 1981–84 között. 1984-ben megvédte kandidátusi értekezését. 1984-től a kölni Max-Planck Intézet csoportvezetője, ahol 2003-ig Jeff Schell-lel dolgozott. 1987-től szegedi laboratóriumának tudományos tanácsadója részidőben. 1995-től EMBO-tag, 2005-től az MTA doktora. Kezdeti kutatásainak eredményei közül 1990-ig ismertebbek az első állati gének kifejeződésének vizsgálata növényekben, a T-DNS egyes génfunkcióinak azonosítása, az első kételemű T-DNS vektorok elkészítése, fénykibocsátó bakteriális luciferáz, szintetikus CryIC Bt toxin és egyéb fehérjét termelő növények előállítása és a T-DNS növényi kromoszomális integrálódását szabályozó mechanizmusok földérítése. Rédei Györggyel való találkozása és barátsága 1986-tól kezdve figyelmét az *Arabidopsis*-ra irányította. További munkájával hozzájárult ahhoz, hogy az *Arabidopsis* a molekuláris genetikai kutatások modellnövényévé váljon. Munkatársaival együtt kidolgozta az *Arabidopsis* T-DNS inszerciós mutagenézis alapttechnikáit, létrehozott egy 120 000 ezer T-DNS-sel transzformált növényből álló mutánsgyűjteményt, és izolálta az első *Arabidopsis* T-DNS inszerciós mutánst. 1996-ban a SALK Intézetben dolgozó Joanne Choryval egy időben bizonyította, hogy a brasszinoszteroidok növényi szteroid hormonok. Ezért 1998-ban az Észak-Rajna Weszfáliai Tudományos és Művészeti Akadémia Karl Arnold-díjával tüntették ki. 2013-ig 160 tudományos közlemény szerzője.

Magyar Zoltán

tudományos főmunkatárs

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet
6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

Egyetemi tanulmányait követően (molekuláris biológus szak, József Attila Tudományegyetem, Szeged) 1989-ben csatlakozott az MTA SZBK Dudits Dénes vezette kutatócsoportjához. Kutatómunkája során a növényi sejtosztódás szabályozását vizsgálta, ahol elsőként sikerült azonosítaniuk olyan növény-specifikus ciklinfüggő protein-kinázokat, amelyek a sejtciklus G2-M fázisában szabályozó szerepet játszanak. Az ebből a munkából írt doktori értekezését 1999-ben védte meg. Még ugyanebben az évben EMBO-ösztöndíjjal a Dirk Inzé vezette kutatócsoporthoz került a Genti Egyetemre, ahol az osztódásba lépés transzkripcionális szabályozó elemeit, az E2F-RB reguláto-

rok szerepét tanulmányozta a növényi kutatások modellnövényében, az *Arabidopsis thaliana*-ban. 2003-tól a Londoni Royal Holloway Egyetemen működő, Bögre László irányította kutatócsoportban folytatta a kutatásait. Itt sikerült kimutatniuk, hogy az egyik növényi E2F transzkripciós faktor mennyire fontos szerepet játszik a növényi növekedési hormon, az auxin által irányított sejtosztódásokban. 2009-ben hazatért Magyarországra, és az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében megalapította saját, a „Növényi növekedés molekuláris szabályozása” elnevezésű kutatócsoportját. Kutatásaik középpontjában a növekedés két alapvető folyamatát, a sejtosztódást és a sejt-megnyúlást szabályozó E2F gének állnak. Kutatási céljaik között az E2F célgének azonosítása és az E2F-RB fehérjekomplexek biokémiai tisztítása és jellemzése szerepel.

Mészáros Tamás

egyetemi docens

Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet
1094 Budapest, Tűzoltó u. 37–47.

Dudits Dénes témavezetésével 2000-ben védte meg a lucerna sejtciklus szabályozását tanulmányozó PhD-dolgozatát. Ezt követően négy évig a Royal Holloway, University of London Bögre László által vezetett laboratóriumában vizsgálta az *Arabidopsis* MAP kinázok szerepét. Hazatérését követően a Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Biokémia és Élelmiszeranalitikai Tanszékén kezdett dolgozni, ahol érdeklődése az *in vitro* transzláció és aptamer szelekció felé fordult. 2007-ben munkahelyet váltva csatlakozott a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetéhez, és jelenleg is ott dolgozik egyetemi docensként. Az utóbbi években kutatómunkájában nagyobb hangsúlyt kapott az *in vitro* transzláción alapuló fehérjeanalízis és a diagnosztikai célú aptamerek szelekciója, de kollaborációkon keresztül továbbra is aktívan részt vesz növénybiológiai kutatásokban.

Mórocz Sándor

kukoricaneemesítő

Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft.
6726 Szeged, Alsó kikötő sor 9.

1951-ben született okleveles agrármérnök, a mezőgazdaság-tudomány kandidátusa, kukoricaneemesítéssel foglalkozó tudományos kutató. 1976 és 2012 között állt alkalmazásban első és egyben utolsó munkahelyén, amely jelenleg a Gabonakutató Nonprofit Közhasznú Kft. néven ismert. Közben vendégkutatóként az MTA SZBK Genetikai, illetve Növénybiológiai Intézetében és a német Höchst AG növényvédelmi kutatások osztályán Frankfurtban dolgozott évekig. Egzotikus kukorica kiindulási anyagok korszerű nemesítési forrásanyaggá alakításának és a szövettenyésztési módszer kukoricaneemesítési alkalmazásának szentelte a kutatói pályáján töltött ideje leg-

jelentősebb részét. Mind tudományos, mind gyakorlati sikereket ért el az a mester-séges rendszere, amelynek segítségével izolált kukoricasejtekből (protoplasztokból) termőképes növényekig lehet eljutni. Ennek a rendszernek a segítségével valósították meg a világon az egyik első ivaros öröklődő fajidegen génbeültetést a kukoricán. Kifejletlen kukorica virágporszemek közvetett és közvetlen szövettenyésztésével munkatársaival olyan kukorica vonalakat hoztak létre, amelyek kísérleti hibridek előállítására és további nemesítési munkára voltak használhatóak. Szövettenyésztési munkája világszerte ismert szabadalmakat eredményezett, míg nemesítői munkája több államilag elismert kukorica hibridnek a létrejöttét segítette intézményében. Dr. Németh Jánost és dr. Szél Sándort követően 2007-től 3 évig volt kinevezett vezetője intézménye kukoricakutatással foglalkozó részlegének. Irányítóként vagy résztvevőként közreműködött több OTKA, OMFB és egyéb pályázatokban, tevékenyen járult hozzá külföldi kutatási megbízások, szabadalmi bevételek elnyeréséhez, kivitelezéséhez, melyek komoly anyagi forrást jelentettek munkaadóinak. A szövettenyésztési és nemesítési munkássága ötvözésével kidolgozott, nemesítési anyagokban is megtestesülő kukoricanemesítési rendszere alkalmazásra és közlésre vár.

Szabados László

tudományos tanácsadó

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Növénybiológiai Intézet

6726 Szeged, Temesvári krt. 62.

A szegedi József Attila Tudományegyetemen 1978-ban szerezte meg biológus diplomáját. Az egyetem után az MTA SZBK Genetikai Intézetében Dudits Dénes csoportjában dolgozott. Egyetemi doktori disszertációját 1982-ben védte meg. 1984 és 1987 között posztdoktorális ösztöndíjjal a Kolumbiában lévő International Center for Tropical Agriculture (CIAT) intézetében, majd 1987 és 1990 között a kölni (Németország) Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung-ban dolgozott. 1990-ben az MTA SZBK Növénybiológiai Intézetében Koncz Csabával közösen alapította meg az *Arabidopsis* Molekuláris Genetikai kutatócsoportot. 1994-ben a biológiai tudományok kandidátusa címet, 2010-ben az MTA doktora címet szerezte meg. Kutatási területe a növények szárazság- és sótűrésének molekuláris szintű szabályozása. Az *Arabidopsis thaliana* modellt használva a kutatócsoportnak több olyan gént sikerült izolálnia, amelyek az ilyen típusú környezeti stresszre adott válaszokat szabályozzák. Kutatási témái közé tartozik a prolinfelhalmozódás szerepének kutatása a só stresszel szembeni ellenálló képesség kialakításában, a mitokondriális elektrontranszport és a stresszválasz kapcsolatának kutatása. A stresszválasz szabályozásában részt vevő faktorok közül elsősorban a hősokk és cink-ujj típusú transzkripció faktorok, valamint a MAP, illetve CRK családba tartozó fehérje kinázok szerepének vizsgálata a csoport fő kutatási területe.

A kiadásért felelős
az Akadémiai Kiadó Zrt. igazgatója
Felelős szerkesztő: Vajda Lőrinc
Termékmenedzser: Egri Róbert
Tördelés: Mocsonoky Gábor
Borítóterv: Eredeti Bt.
A nyomdai munkálatokat a Prime Rate Kft. végezte
Felelős vezető: Tomcsányi Péter
Budapest, 2014
Kiadványszám: TK140026
Megjelent 25,2 (A/5) ív + 22 oldal színes melléklet terjedelemben