

GENETIKAI TRANSZFORMÁCIÓ — DNS-SEL — EUKARIOTA SZERVEZETEK BEN*

SZABÓ GÁBOR

Debreceni Orvostudományi Egyetem, Biológiai Intézete

Az akadémiai székfoglalók hagyományosan az életmű bemutatására szolgálnak, vagy legalábbis egy-egy hosszabb kutatási periódus bemutatására hivatottak. Szíves engedelmükkel ettől kicsit eltérnék és inkább arról a munkákról számolnék itt be, amelyeket az utóbbi néhány évben végeztem és amelyek jelen pillanatban is folyamatban vannak, amelyeket — úgy hiszem a jövőben is folytatni fogunk. Jelen előadásban a DNS-sel, az öröklődő tulajdonságokért felelős anyaggal történő genetikai átalakítás, transzformálás szabályszerűségeivel foglalkozom.

Az élőlények öröklődő tulajdonságainak *irányított megváltoztatása* ősi törekvés, amelynek jelentősége a mezőgazdasági és ipari gyakorlat, valamint az orvostudomány számára is kézenfekvő. E cél elérésének máig is sikeresen alkalmazott módszere a természetben előforduló változatok szelektálása. E szelekció egyik előfeltétele az élőlények variabilitása, és megfelelő szelekciós módszer.

A variánsok előállítása keresztezéssel, mutagén behatással történhet, ill. bakteriális rendszerben vírusokat, episzomális elemeket és tisztított DNS-t használnak fel öröklődő tulajdonságok átvitelére.

A gének izolálásának és nagy számban történő tisztított előállításának lehetősége bakteriális rendszerben, jelentősen fokozza egy-egy új tulajdonság átvitelének gyakoriságát.

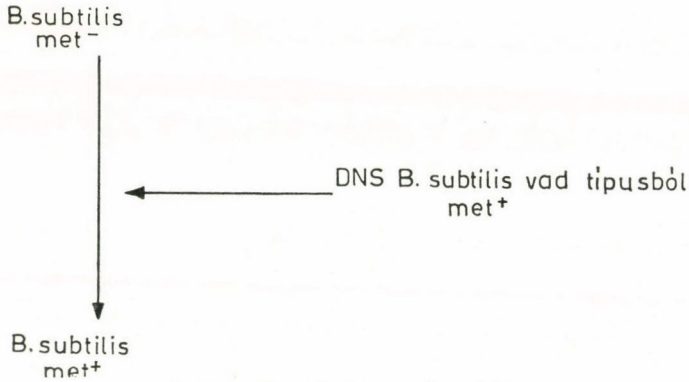
A genetikai transzformáció, azaz információ átadás egyik sejtből a másikba izolált DNS-sel a viszonylag egyszerűbb protocellulákban több évtizede leírt, tanulmányozott, gyakran alkalmazott, igen jól reprodukálható eljárás.

A jelenség lényegét az 1. ábrán demonstráljuk. Ha pl. egy baktérium mutációt szenved, kromoszóma szerkezetének megváltozása miatt egy-egy fehérjét nem tud funkcióképesen szintetizálni, és ezt a populációt az ún. vad típusú, egészséges törzsből származó DNS-sel kezeljük, akkor megfelelő kísérleti körülmények között a kívülről bejuttatott DNS beépül a recipiens, a befo-

* Elhangzott a Magyar Tudományos Akadémián 1978. április 24-én.

gado sejt kromoszómájába és a szerzett genetikai információ képessé teszi a mutánst elvesztett funkciójának helyreállítására.

Eukarioták — tehát a magasabbrendűek, a valódi maggal bíró sejtes szervezetek, amelyek közé a növények, állatok többsége és az ember is tartozik — genetikai transzformációját 1944-ben TATUM és LEDERBERG kísérte



I. ábra. Genetikai transzformáció

meg először *Neurospora crassa*-val, a genetikai kísérletekhez használt kenyérgombával, de akkor sikertelenül. Azóta az irodalomban állandóan visszatérő módon olvasható híradás arról, hogy sikeresen transzformáltak eukariota sejteket, szervezeteket. Az 1. táblázatban összeállítottunk néhány ilyen jegyzékét. Látható, hogy mind állati, mind növényi szervezetek — valamint szövettenyészetek genetikai transzformációját leírták. Ugyancsak szép számmal található mikroszkópos gombák transzformációjára vonatkozó adatok; sok összefoglaló cikk, nemzetközi szimpózium stb. foglalkozott e kérdéssel. Ennek ellenére egyet kell érteni WATSON 1976-os véleményével, aki szerint: „mindaddig az eredmények negatívaknak bizonyultak . . . túlságosan kevés jó kísérletet végeztek eddig ahhoz, hogy az lehessen az érzésünk, hogy ezt a típusú genetikai analízist ki lehessen terjeszteni magasabbrendű élőlényekre is”.

Az irodalmi adatok, valamint TATUM 1944-ben, majd 1962-ben SHOCKLEY-val megismételt kísérletei arra utalnak, hogy a genetikai transzformáció — ha egyáltalán előfordul — rendkívül kis gyakorisággal jön létre; a kísérletek reprodukálhatósága igen rossz, bizonytalan és a DNS beépítéssel újonnan szerzett tulajdonság általában nem stabil, az utódokban meg sem jelenik, elvész — vagy ha öröklődik, öröklésmenete eltér a mendeli kromoszómához kötött jellegétől.

A sikertelenség, bizonytalanság, rossz reprodukálhatóság és a kérdés elméleti, valamint gyakorlati jelentősége indított arra bennünket 1971—72-ben a Rockefeller Egyetemen prof. Tatum laboratóriumában prof. Mishra-val

1. táblázat

Adatok sikeres transzformációról eukarióta rendszerben

Organizmus	DNS-forrás	Év
NÖVÉNYEK Arabidopsis Petunia	baktérium piros petunia	1974 1970
ÁLLATOK Drosophyla melanogaster Halak Szárnyasok Rágcsálók	vad típusú Drosophyla halak szárnyasok rágcsálók	1971, 1976 1976 1957, 1961, 1975 1956, 1959, 1976
SZÖVETKULTÚRÁK Sarlósejtes anaemiás humán csontvelő HGPRT igényes humán csv. 8-azaguanin szenzitív egér limfóma Pigment hiányos melanoma Tirozináze igényes melanoblast Szarkolizin szenzitív patkány szarkóma	normál csontvelő normál csontvelő 8-azaguanin rez. egér limfóma melanoma pigmentosa normál egér szarkolizin rez. szarkóma	1961 1962 1962, 1970 1967 1969 1964
MIKROORGANIZMUSOK Saccharomyces Hansenula Candida Aspergillus Neurospora	vad típusú Saccharomyces vad típusú Hansenula vad típusú Candida vad típusú Aspergillus vad típusú Neurospora	1974 1969 1961, 1971, 1976

együtt (SZABÓ et al., 1972, MISHRA et al. 1973), hogy a kérdés vizsgálatát ismét megkíséreljük. Kísérleteinkhez *Neurospora* (N.) *crassa*-t alkalmaztunk, amelynek előnye, hogy vegetatív szaporodási fázisában haploid élőlény, tehát eltér a növényi és állati szöveti sejtektől, amelyek diploidok és amelyekben a dominancia és recesszivitás fennállta befolyásolja a jellegek megjelenését, ahol egy-egy homozigóta recesszív állapot külső behatással, mutációval, DNS-sel történő korrigálásának az egyidejű bekövetkezte hatványozottan csökkent valószínűségű. Előnye továbbá a gyors és egyszerű szaporodási, tenyésztési lehetőség, valamint az, hogy kromoszóma, ill. géntérképe, genetikája egyike a legjobban tanulmányozottnak, szexuális szaporodásakor kromoszómájának, géneinek viselkedése igen jól nyomon követhető. Szerencsés körülménynek tekinthető, hogy transzformációhoz olyan mutáns törzs állott rendelkezésre, melynek spontán vad típusúvá való visszaalakulása az ún. back-mutáció-reverzió rendkívül ritkán következik be. A kísérletekhez használt egyik mutáns, egy inozitol-igényes törzs volt, melynek hiányzik az inozitol szintáze (glukóz-6-foszfát-cikláz) enzim aktivitása, tehát ismeretes a genetikai deffektussal együttjáró anyagcsere-zavar, enzimműködés kiesés is.

Az első kísérleteink eredményét a 2. táblázatban láthatjuk, melyből leolvasható, hogy a vad típusú tenyészetből előállított DNS-sel (allo-DNS)

történő kísérlet hatására a spontán bekövetkező reverzió gyakoriságát több mint 10-szer meghaladó számban keletkeznek inozitol-igénytelen törzsek.

Felhívom a figyelmet azonban arra, hogy a revertánsok megjelenése igen ritka esemény. Látható az is, hogy a nagy számban — 55 alkalommal — végzett kísérlet egy részében (23%-ban) nem kaptunk pozitív eredményt, azaz a DNS-sel történő kezelés eredménytelen volt.

2. táblázat

Az allo-DNS hatása az *N. crassa* inl^- lokuszának reverziójára

Kezelés	Kísérletek száma	Vizsgált telepek száma (10^6)	Revertánsok	
			száma	gyakorisága $\times 10^{-6}$
Allo-DNS (inl^+)	55 (37)*	405,3	387	0,95
Izo-DNS (inl^-)	4 (1)*	335,0	9	0,03
Citrát	49 (7)*	582,9	23	0,04
DNáz emésztett allo-DNS	5 (0)*	10,2	0	0

*reverziót eredményező kísérletek.

Ezek a kísérletek megerősítik, hogy az *irodalomban található ellentmondások valóságosak*, hiszen ugyanazon kísérletezők kezében, a kísérleti paraméterek gondos azonosságát feltételezve kaptunk pozitív és negatív eredményt. A kísérletsorozat összefüggő értékelése viszont megerősített abban, hogy a DNS-sel specifikusan növelni lehet egy gén reverzióját, a transzformációt.

A reprodukálhatóság bizonytalansága miatt munkatársaimmal (SCHABLIK et al., 1977a., b.; ZSINDELY et al., 1977a., b.; ARADI et al., 1977; KISS Á., SZABOLCS M.; SZABÓ et al., 1973 és 1975; Fekete Rudolfné, Kántor Margit) a DOTE-n az *N. crassa* DNS-felvételének körülményeit igyekeztünk tisztázni, feltételezve, hogy a hatásos transzformáció előfeltétele a DNS-molekula felvétele és az átalakítandó kromoszómához való eljutása. A transzformáció feltételei között először a DNS-molekula méreteit vizsgáltuk meg, ugyanis a baktérium transzformáció sikerének egyik feltétele az, hogy a DNS-molekula elég nagy, milliós nagyságrendű legyen. Sikerült kb. 10×10^6 nagyságú, kis molekulásúlyú fragmentumot alig tartalmazó DNS-preparátumot előállítani. A DNS-molekula *N. crassa*-ba történő bevitelének mértékét radioaktív DNS segítségével vizsgáltuk.

A 3. táblázatban foglaltuk össze azokat az általunk vizsgált tényezőket, melyeknek az állandósítása, ill. biztosítása nélkül érthető, hogy korábbi kísérleteinkben miért kaptunk egyszer pozitív, máskor negatív eredményt. A molekuláris DNS-felvételt az enzimatikusan bontott DNS gátolja, tehát a tisztítás nélküli preparátum eltérő bomlottsága oka lehet az eredménytelenségnek.

A makromolekula bomlását a *N. crassa* által termelt DNáz előidézheti. A DNáz időbeli megjelenésének vizsgálata azt mutatta, hogy a fiatal — 18—20 óras — tenyészetben még viszonylag alacsony a DNáz-aktivitás, tehát célszerű ilyen korú tenyészetekkel végezni transzformációs kísérleteket. A DNáz bontó hatását csökkenteni lehet a DNS oldathoz adott polikationokkal (protaminszulfát). A DNS felvételének optimális pH-ja 6,35, hőmérséklete 37 °C és optimális

3. táblázat

A DNS felvételét befolyásoló tényezők

Donor DNS	molekula méret koncentráció natív, ill. denaturált forma
Recipiens sejtek	kor — nukleáz tartalom fiziológiai állapot
Inkubációs közeg	pH Ca ⁺⁺ EDTA hőmérséklet Oxigén Na azid

Ca⁺⁺ (50—75 mM) igénye van. A baktériumokkal ellentétben az egyfonalas DNS felvétele is végbemegy éppúgy, mint a natív duplaspirálé, sőt a felvételi rátája gyorsabb is, mint a natívé. Igen lényeges a recipiens *N. crassa* fiziológiai állapota. Maximális DNS felvételt a 20 órás tenyészetben találtunk, idősebb korban a felvétel minimális. A fiatal tenyészet sok növekedő csúccsal bír és okkal tételezzük fel, hogy a felvétel mértéke a csúcsoknak az össz-hifa hosszhoz viszonyított arányától függ. Az *N. crassa* DNS felvételének optimális feltételeit betartva, eddig végzett kísérleteink konzekvensen pozitív eredménnyel zárultak (4. táblázat).

4. táblázat

A natív és emésztett DNS hatása a *N. crassa* *inl*⁻ lokuszának reverziójára

A kísérletek száma	A kezelés módja	<i>Inl</i> ⁺ revertánsok száma × 10 ⁻⁷		Emelkedés mértéke
		natív DNS	DNáz kezelt DNS	
1.	Allo-DNS(<i>inl</i> ⁺)	5	1	5
2.		12	1	12
3.		8	1	8
1.	Izo-DNS(<i>inl</i> ⁻)	3	3	—
2.		1	2	—
3.		0	1	—

$$\text{Emelkedés mértéke} = \frac{\text{Allo-DNS kezelés hatására megjelent revertánsok száma}}{\text{Spontán revertánsok száma}}$$

A vad törzs DNS-felvétele elenyésző, gyakorlatilag nulla. A vad törzsből származó éppen csírázott konidiumok DNS-felvételének mértéke (szárazanyagra számítva) összevethető a mutáns törzssével, azaz elvileg bármely *Neurospora* DNS-sel történő transzformálására lehetőség van.

Talán nem hiábavaló megemlíteni, hogy az inl^- , kolonialisán növekvő törzs kiválasztásakor nem gondoltunk arra, hogy ennek a törzsnek ilyen speciálisan kedvező tulajdonságai vannak. A véletlen szerencse segített.

Az eukarioták genetikai transzformációjának kutatását a DOTE Biokémiai Intézete már említett kutatóinak segítségével kiterjesztettük a vizsgált tulajdonságot meghatározó gén tanulmányozásán túl az általa meghatározott enzimre is. Az enzimfehérje analízise lehetővé teszi, hogy a gén szintjén történő változásokra következtethessünk. Az inozitol szintáz izoláltuk, néhány tulajdonságát az 5. táblázatban tüntettük fel. Figyelemre méltó, hogy az enzim komplex 4 alegységből áll. Ugyancsak sikerült az inl^- — tehát enzimaktivitással nem rendelkező — törzsből is izolálni egy fehérjét, amely immunológailag az aktív enzimhez hasonlított. A DNS-sel transzformált és egy spontán mutációval revertált inl^+ törzs izolált inozitol szintázának tulajdonságait a következő (6.) táblázatban foglaltuk össze. A táblázatból látható, hogy a reverzió során az enzimaktivitás visszatér, de eltérő mértékben. Rendkívül érdekes lesz annak megállapítása, hogy az inaktív fehérje miben különbözik a vad törzs enzimjétől és hogy a back-mutáció, ill. transzformáció során milyen nagy polipeptidért felelős DNS-darabokat sikerül megváltoztatni. Az eukariota gének szerkezet-felderítésére folyó új kísérleti eredményekre gondolva — amely szerint még egyetlen polipeptid struktúrgénje is egymással nem folytatólagosan elhelyezkedő DNS-szakaszok által kódolt — remélhető, hogy ezen a módon az eukariota génszerkezet felderítése terén új megközelítés, új módszer áll rendelkezésünkre.

A kísérletek tehát egyértelműen azt mutatták, hogy kívülről bevitt DNS-sel eukariota mikroorganizmus genreverzióját szignifikáns mértékben növelni lehet.

5. táblázat

Tisztított inozitol-1-foszfát szintáz molekuláris jellemzői

Szedimentációs koefficiens	8,0 S
Molekulásúly	225 000 dalton $\pm 5\%$
Alegység összetétel	2 = 64 000 dalton 2 = 50 000 dalton
Specifikus aktivitás	4800 U/mg protein
Michaelis állandó (K_M)	1,82 mM (G-6-P)*

*glukóz-6-foszfátra vonatkozóan

6. táblázat

Különböző *Neurospora crassa* törzsekből izolált inozitol-1-foszfát szintáz néhány tulajdonsága

Törzs	Specifikus aktivitás	Michaelis* állandó
Vad típus	4800 U/mg protein	1,82 mM
Transzformáns	2860 U/mg protein	2,40 mM
Spontán revertáns	980 U/mg protein	2,60 mM
Inl ⁻ mutáns	—	—

* glükóz-6-foszfátra vonatkozóan.

A transzformációval foglalkozó irodalomban nemcsak a transzformáció ténye vitatott, bár egyre több közlemény lát napvilágot arról, hogy kromoszómában, vírusban levő DNS-sel, ill. utóbbi fragmentumaival lehet új tulajdonságot átvinni emlős sejtekbe, de a transzformációval keletkezett új tulajdonság öröklődésmenetét is rendkívülinek találták. A tulajdonság gyakran elvész vegetatív szaporodás közben is, de pl. *Drosophila* esetében az utódokra való átvitel — a szexuális ciklusban tulajdonság átadása — egyáltalán nem történt meg. Az *N. crassa*-val végzett kísérletek és anomáliák, nem-mendeli öröklődésre utalnak. A vad típusú törzsből előállított DNS-sel létre lehetett hozni az inl⁻ törzsből inl⁺ klónokat, de e tulajdonsággal rendelkező törzs, tehát az inl⁺ (transzformáns) egy standard inl⁻-szal keresztezve (7. táblázat) a várt mendeli

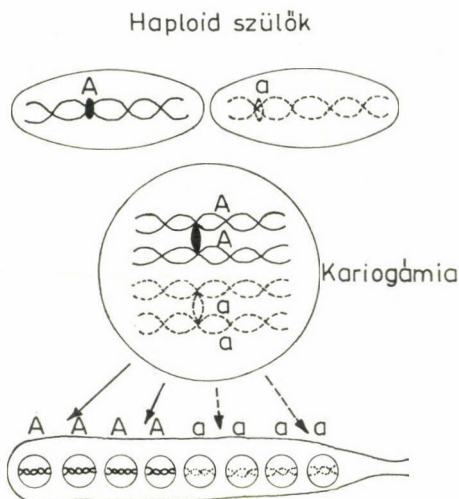
7. táblázat

Allo-DNS kezelés hatására megjelent inl⁺ revertánsok* genetikai (random spóra) analízise

Törzs száma	inl ⁻	inl ⁺
	utódok száma	
1	90	91
2	197	151
3	457	239
4	374	117
5	1 608	893
6	126	3
7	297	3
8	369	0
9	700	0
10	20 000	0
11	100 000	0

* inl⁺ rev. × inl⁻ (89601)

1 : 1, 50—50% aránytól eltérő utódarányt hozott létre. Amint a sematikus (2.) ábrából látható, a haploid szülői szervezetek keresztezésekor létrejön az átmenetileg diploid, megkettőződött kromoszómaanyaggal rendelkező zigóta, amelyből a meiotikus osztódás szétválasztja az ellentétes tulajdonságokkal rendelkező kromoszómákat és a mendeli öröklődés szerinti mindkét szülői formából azonos



2. ábra. Szexuális ciklus

számú utód (4 : 4) keletkezik. Amint a 7. és 8. táblázat mutatja, a valóságban a transzformáns inl^+ törzsnek egy része keresztezéskor szabályosan mendelezett, másik része viszont eltér attól, és az utódok között az inl^+ aszkospórák 50% arány helyett ennél kisebb számban voltak megtalálhatók. A jelenség magyarázatára MISHRA és TATUM (1973) a *Drosophila* transzformációra kidolgozott ún. exosoma modellt (3. ábra) fogadták el. E szerint a kívülről bejuttatott DNS-darab kétféle állapotban fordulhat elő. A neki megfelelő lokusszal kölcsönhatásba lépve azzal paralel, szinkron, vagy attól függetlenül osztódik, ill. integrálódhat a kromoszómába is. A nem integrált forma elveszhet, eliminálódhat.

E modell a baktériumok episzom elemeihez analóg elképzelésen alapszik és igaz voltának, használhatóságának következményei rendkívüli jelentőséggel bírnak. Eukariota mikroorganizmusok vírusairól vannak ugyan adatok, de olyan — a kromoszómától függetlenül szaporodó — DNS-t, mint pl. a baktérium plazmid, temperált fág, még nem írtak le. Az exoszómáról éppen ilyen tulajdonságokat tételeznek fel.

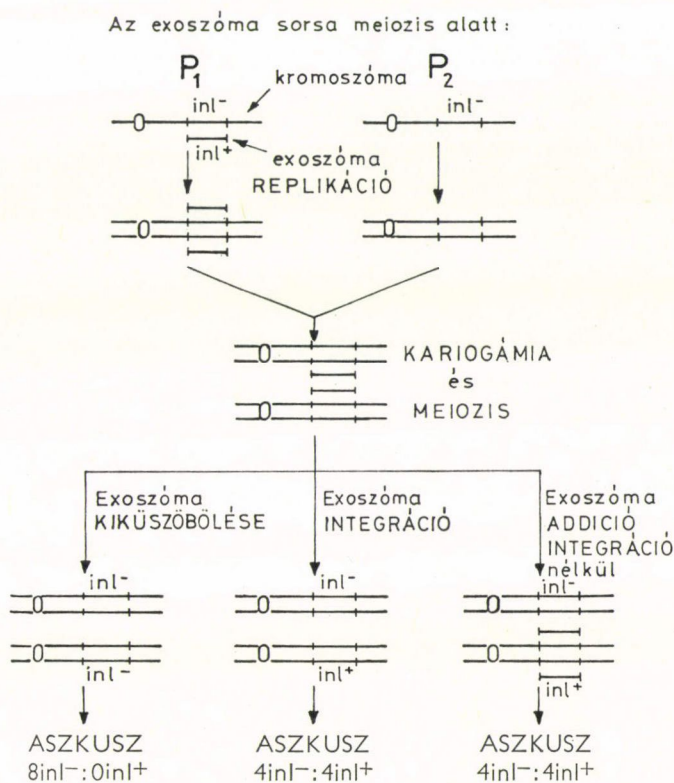
Az eukariota mikroorganizmusban szaporodó plazmidszerű exosóma létezése lehetővé tehetné a baktériumokra kidolgozott génmanipuláció, génsebészet módszereinek közvetlen alkalmazását eukariota rendszerben.

8. táblázat

Allo-DNS kezelés hatására megjelent inl^+ revertánsok genetikai (random spóra) analízise

Törzs száma	inl^+	inl^-	inl^+ %	Törzs száma	inl^+	inl^-	inl^+ %
	utódok száma				utódok száma		
1.	1033	2 000	34,3	9.	3087	63 743	4,62
2.	5533	14 967	26,99	10.	450	11 550	3,75
3.	340	1 210	21,93	11.	5533	14 967	2,00
4.	3950	16 550	19,27	12.	165	11 665	1,39
5.	3650	19 350	15,87	13.	800	68 400	1,10
6.	165	1 085	13,20	14.	1	1 599	0,062
7.	3100	27 730	10,05	15.	2	5 496	0,036
8.	175	1 825	8,75				

inl^+ rev. $\times inl^-$ (89601)



3. ábra. Exoszóma modell

A szóban forgó kísérleti eredmények azonban — szerintünk — értelmezhetőek a genetika klasszikus törvényszerűségének alkalmazásával is. Szerintünk a nem-mendeli viselkedésért, a kisszámú inl^+ magarányért a gombafonalak heterokariota állapota, kétféle magnak azonos plazmában, egy időben való előfordulása a felelős. Erre a következtetésre elméleti megfontolás és kísérleti eredmények készítettek.

A kísérleteket ugyanis úgy végezzük, hogy az inl^- gombafonalakból apróra vágott fonaldarabokat kezelünk DNS-sel és az így kezelt fonalakat szélesítjük ún. minimális táptalajra, amelyen csak a transzformált vagy back-mutációval revertált inozitolt szintetizáló telepek növekednek. Amikor meghatároztuk a hifa darabok átlagos DNS-tartalmát, kiderült, hogy azokban a magok száma 100—1000 között változik, tehát az inl^+ mag, ha létrejön, minimálisan 99—999 inl^- mag társaságában, közös cytoplazmában kerül a minimális táptalajra, ahol — ha az inl^- magvak legalább fenti számban megtalálhatók, az inozitolt termelő inl^+ magvak mellett el is szaporodhatnak. Tehát elvileg minden revertáns: heterokariota.

Az exoszóma modell alkalmazása ellen szóltak azok a kísérletek, amelyekben a spontán revertánsokat kereszteztük és vizsgáltuk az utódok inl^+ egyedeinek arányát.

A transzformánsokkal analóg eredményt kaptunk, azaz a mendeli 50%-tól kezdve az attól való eltérés minden fokozata (l. fentebb a transzformánsokra vonatkozó 7. és 8. táblázat) megtalálható, ha a revertánst nem szelektáló táptalajon tartjuk (9. táblázat).

9. táblázat

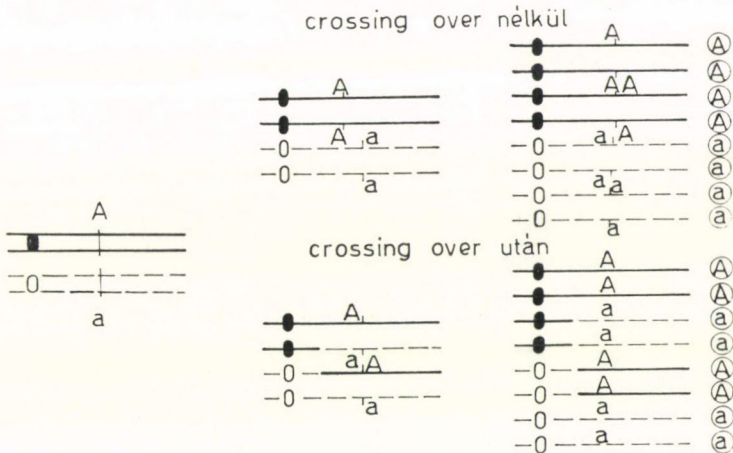
Spontán inl^+ revertánsok genetikai (random spóra) analízise

A törzs száma	inl^+	inl^-	inl^+ %
	utódok száma		
1.	620	1 180	34,44
2.	1737	15 928	10,80
3.	3275	34 055	8,8
4.	2687	31 643	7,8
5.	1637	25 500	6,4
6.	130	2 453	5,0
7.	95	1 805	4,1
8.	186	7 479	2,43
9.	600	26 056	2,25
10.	0	915	0,0

inl^+ rev. \times inl^- (89601)

Az exoszóma modell feltételezése szerint — mint láttuk — a kívülről bejutott DNS nem integrált formában található és gyakran elvész. Arra gondoltunk, hogy az inl^+ tulajdonság genetikai viselkedését legjobban a szexuális folyamat után ún. tetrád-analízissel követhetjük nyomon; az *N. crassa* előnye épp az, hogy a kromoszómák, a gének elkülönítését keresztezéskor meiozisban, majd az ezt követő mitotikus osztódás során pontosan nyomon lehet követni. Ha ugyanis az exoszóma eliminálódik, akkor az utódok között $4 inl^+ : 4 inl^-$ helyett az inl^- utódok számának növekedését várnánk, ill. ha autonóm módon szaporodnak, akkor az inl^+ számának emelkedése következne be. Tetrád-analízis során a gének centromertől való távolsága is meghatározható.

A 4. ábrán vázlatosan látható, hogy ha az első meiotikus osztódásnál nincs vagy van crossing-over, akkor ettől függő aszkospórasorrendet találhatunk az aszkuszokban. A crossing-over bekövetkeztének valószínűsége a centromertől való távolsággal egyenes arányban nő. Minél távolabb van egy lokusz a centromertől, annál gyakrabban megy végbe a crossing-over, amelyet a II.



4. ábra. Gének elkülönülése

meiotikus osztódáskor bekövetkező szegregáció mutat. A szabályos 8—8 aszkospórárt tartalmazó elegendő számú aszkusz átvizsgálásából, a rekombináció gyakoriságából (lásd a 10. és 11. táblázatot) számítva az inl^+ lokusz távolsága azonosnak adódott mind a múzeumi ún. vad inl^+ , a DNS-sel előállított, vagy spontán reverzióval létrejött inl^+ törzsek esetében. Levonható tehát, hogy az inl^+ tulajdonság, amelyet kívülről bevitt DNS-sel hoztunk létre, az ötös kromoszómán az inl lokuszra integrálódva található. A $4 : 4$ arányt mutató tetrádokból származó klónok továbboltások esetében tisztán és stabilan adódnak tovább az utódoknak, azaz inozitol jelenlétében tenyésztve sem találunk heterokariozusra utaló jelt, az inl^+ tulajdonság állandó.

10. táblázat

Inl⁺ transzformált és kontroll törzsek tetrad típusai

Keresztezés	4 inl ⁺ : 4 inl ⁻	6 inl ⁺ : 2 inl ⁻	2 inl ⁺ : 6 inl ⁻	5 inl ⁺ : 3 inl ⁻	0 inl ⁺ : 8 inl ⁻	Összesen
5. transzformált törzs (inl ⁺) × *standard törzs (inl ⁻)	33	1	2	2	32	70
6. transzformált törzs (inl ⁺) × *standard törzs (inl ⁻)	19	1	0	0	14	34
T ₁₄ K/2 spontán revertáns (inl ⁺) × *standard törzs (inl ⁻)	29	0	0	0	0	29
RL-3-8 (inl ⁺ mt ^A) × R 2506-5-101 (inl ⁻ mt ^A)	29	0	0	0	0	29

* Standard törzs: 89601-5-5 (inl⁻, mt^A)

11. táblázat

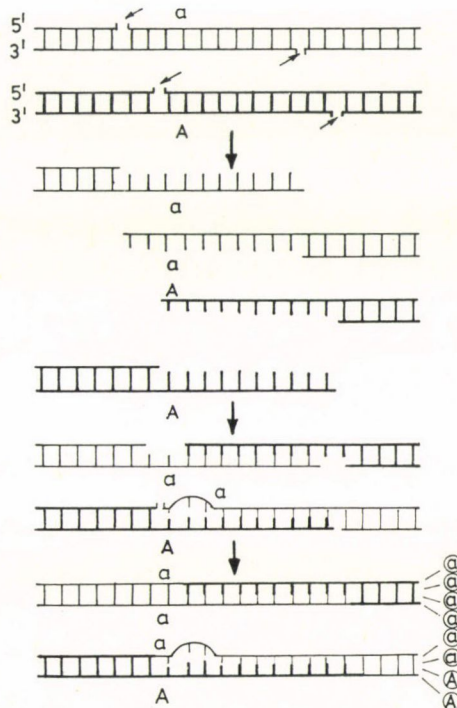
Az inozitol lokusz viszonya az V. kapcsolt csoport centromérjához

Keresztezés	Rekombinánsok	Rekombináció % térkép egység
	össz. vizsgált	
5. transzformált törzs (inl ⁺) × * standard törzs (inl ⁻)	16/38 (ascus)	21,0
6. transzformált törzs (inl ⁺) × * standard törzs (inl ⁻)	7/20 (ascus)	17,5
T ₁₄ K/2 spontán revertáns (inl ⁺) × * standard törzs (inl ⁻)	14/29 (ascus)	24,1
RL-3-8 (inl ⁺ mt ^A) × R 2506-5-101 (inl ⁻ mt ^A)	14/29 (ascus)	24,1

* Standard törzs: 89601-5-5 (inl⁻, mt^A).

Amint a 10. táblázatból látható az inl^+ és inl^- törzsek keresztezésekor túlnyomó többségben 4 : 4 arányú mendeli öröklődés tapasztalható, vagy 0 : 8 arányban inl^- aszkospórákat kapunk. A 4 : 4 arányt adó szabályos tetrad kromoszómához kötött gének öröklődését jelenti, a 0 : 8 arányban talált inl^- utódok viszont azt jelenthetik, hogy az inl^+ -nak tekintett törzs heterokariota volt, kétféle, inl^+ és inl^- maggal rendelkezett. Utóbbiakat inl^- törzssel keresztezve kapjuk a 0 : 8, azaz csupa inl^- aszkospórákat tartalmazó aszkuszokat. Ha a genetikai analízis során az aszkospórákat nem abban a sorrendben vizsgáljuk, izoláljuk mikroszkópi kontroll mellett, amelyben a kromoszómák szegregálódása is történik, hanem véletlenszerűen, összekeveredve, ún. random spóra analízissel, akkor érthető, hogy nem kapunk 50—50%-os inl^+ és inl^- előfordulást, mégpedig az inl^- magok heterokariotákban való gyakoriságától függően, csökkent számban találjuk az inl^+ klónokat.

A 10. táblázatból azonban az is kiderül, hogy a transzformáns törzsek közül különösen az 5-ös számú törzs aszkuszából 5 esetben a 4 : 4 aránytól eltérő spórarányokat láttunk, mégpedig 6 : 2, ill. 5 : 3 arányban. E nem-mendeli öröklődésmenetet a génekonverzióknak nevezett folyamattal szokás magyarázni. A génekonverzió keletkezésének molekuláris magyarázata nem egységes. A közös vonások között lényeges az 5. ábrán látható folyamat,



5. ábra. Génekonverzió keletkezésének vázlata crossing over esetében

amely szerint a crossing-over-ben részt vevő Watson—Crick-fonalak nem teljesen azonos nukleotidánál szakadnak szét, a szálak szabad részei nem teljesen komplementerek. Az újragegyesülés kapcsán a párosodó DNS-szálak kapcsolódásakor éppen a fenti ok miatt heteroduplex, azaz egymással nem teljesen komplementer DNS-duplafonalak jönnek létre. Így válik lehetővé, hogy a nem jól párosodó bázisok kivágása után történő ún. kijavítás DNS-szintézissel, vagy kivágás nélkül történő replikációval az allelomorf gének nem egyenlő számban fordulhatnak elő, a várt 4 : 4 típusú tetrádok helyett 6 : 2, 5 : 3 stb. összetételű tetrádokat találunk. Feltűnő, hogy a transzformánsok keresztezésekor a génkonverziók száma jelentősen megnövekedett. A kontrollban az irodalmi utalások, más markerekre vonatkozóan a génkonverziós aszkuszkok számát 1% körüli értékre teszik. A transzformánsok között — mint látjuk — ennek sokszorosát (15%) találtuk.

Megállapítható, hogy a DNS-sel kapott inl^+ transzformáns törzs(ek) génkonverzióra utaló tetrádokat váratlanul, igen nagy számban képez, amelyek okát egyelőre nem tudjuk. A 6 : 2 és 5 : 3 spóraarányok magyarázatára azonban az exoszóma modellt nem kell igénybe venni, hiszen a génkonverziókat transzformációtól függetlenül fedezték fel. Felmerül azonban a kérdés, hogy az ilyen nagy számban — 15%-ban — talált nem-mendeli szegregálódás létrejöttének nem más oka van-e, mint amivel a génkonverziók létrejöttét magyarázni szokás.

Annyival is inkább jogos ez az ellenvetés, mert a konverziós tetrád egyikének utódait vizsgálva olyan öröklésmentet tapasztaltunk, amelyet a génkonverzióval létrejövő aszkospórák modelljével értelmezni nem lehetett. Az egyik (l. a 12. táblázatot) 6 inl^- : 2 inl^+ tetrád aszkospóráiból származó két klónt vizsgálva kiderült, hogy az inl^+ -nak talált aszkospórából származó utódok között inozitolon való átoltások után alig találunk inl^+ magokat, tehát maga a kiinduló aszkospóra, amelynek csupán egyetlen haploid genomot szabad tartalmaznia, az inl lokuszra nézve heterozigota, mert mitotikus oszlásai során az inl^+ tulajdonság elveszhet és az inl^- tulajdonságért felelős gén juthat

12. táblázat

Génkonverzió során keletkezett inl^+ magok számának változása inozitol tartalmú táptalajon történő átoltás során

Átoltások száma	Inl^+ magok gyakorisága		
	5 T 7. sz. klón*	7-5. sz. klón**	6 T***
1	$>10^{-6}$	1	1
2	—	—	—
3	$>10^{-7}$	$>10^{-5}$	1

* 5 T ($inl^+ rg^- mt^a$) \times 89601-5-5 ($inl^- rg^+ mt^A$).

** 7. klón ($inl^+ rg^- mt^a$) \times 89601-5-5 ($inl^- rg^+ mt^A$).

*** 6 T ($inl^+ rg^- mt^a$) \times 89601-5-5 ($inl^- rg^+ mt^A$).

érvényre. A jelenség értelmezése igen egyszerű lenne az exoszóma feltételezésével, hiszen ez kromoszómába nem integrálódott DNS-darabokat tétel fel, amely mellett ott található allelomorf génpárja is, tehát eliminálódása esetében érvényre juthat.

Az exoszóma létezésének bizonyítására azonban e megfigyelésünk nem elegendő.

Az irodalom tanulmányozása során kiderült ugyanis, hogy az *N. crassa*-val foglalkozók (MITCHELL et al., 1952) már régóta ismerik azt a genetikai anomáliát, amelyet pseudovad típus elnevezéssel illetnek. Ennek az a lényege, hogy vannak olyan aszkospórák, amelyek nem haploidok, tehát utódaik között mindkét allelomorf génnel rendelkező klón megtalálható. Ennek magyarázata viszont nem az exoszóma feltételezése szolgált, hanem nondiszjunkció, azaz a kromoszómák diszómíája. Az emberi kromoszóma rendellenességek között is jól ismert mono-, ill. triszómiákhoz hasonlóan az *N. crassa* aszkospórái is lehetnek mono-, di-, ill. nullszómiások. Ha minden kromoszómából egy található, akkor haploid, monoszómiás, életképes, ha diszómiás, akkor adott kromoszómából kettő van, ez is általában életképes, míg az utód, amelybe a kromoszómák szét nem válása, nondiszjunkciója miatt nem jutott kromoszóma, nullszómiás, életképtelen.

Ez a magyarázat, a mi eredményeinkre azonban nem kielégítő, mert mi mindig teljes, tehát 8 ép, növekedésre alkalmas aszkospórákat tartalmazó aszkuszokkal foglalkoztunk, amelyekben abortív spóra nem volt, tehát a diszómia keletkezésének nondiszjunkciós teóriáját el kellett vetnünk.

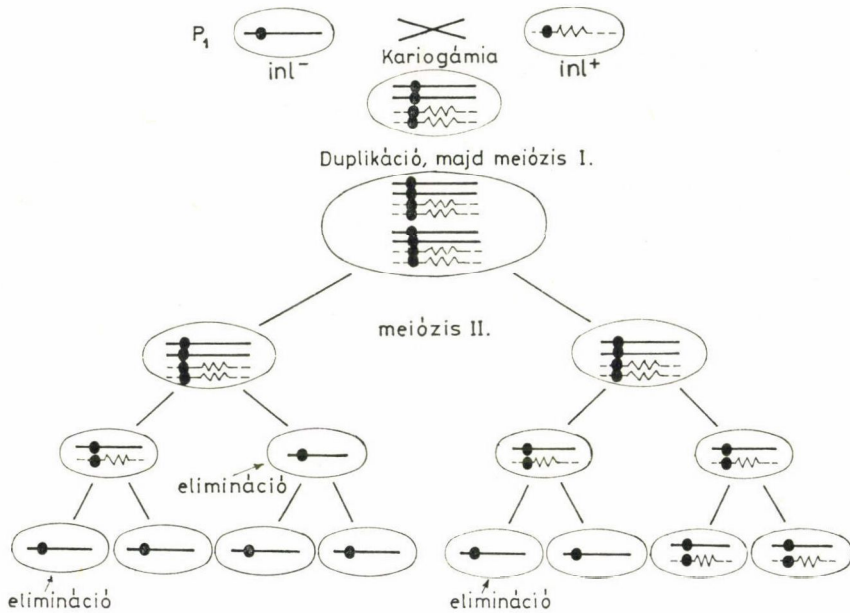
Az irodalomban azonban léfnak olyan pseudovad, tehát kétféle genomot tartalmazó aszkospórából származó tenyészetet is (COYLE és PITTENGER 1965, CASE és GILES 1964), amely a mi megfigyelésünkkel azonos módon, 8 aszkospórárt tartalmazó tetrádból származott. Az irodalmi példákban azonban ennek a megfigyelése nem kapcsolódik a genetikai transzformációhoz, így fel sem merülhetett az exoszóma modell alkalmazásának lehetősége.

Bár elfogadott elmélete a pseudovad típusú klónok létrejöttének nincs, kielégítő hipotézisként szolgálhat az a feltevés, hogy az inl^+ transzformáns törzs genomjainak hatására meiosis során kromoszóma duplikáció megy végbe valamennyi kromoszómára nézve, amelyet a meiosis folyamatában az egyes kromoszómák véletlenszerű, de az inl^+ tulajdonságot hordozó kromoszómák törvényszerű eliminálódása kíséri. Tekintettel arra, hogy mi csupán az inl lokuszra szelektáltunk, ezért úgy véljük, hogy parciális diploidot, csupán az inl^+ lokuszra, ill. kromoszómára nézve kapunk, mert bár a haploidizációs tendencia az *N. crassa*-nál igen jelentős, viszont az inl^+ kromoszóma, ill. gén minimális táptalajon nem tűnhet el (6. ábra).

A parciális diploid kialakulása diploidizáció és progresszív haploidizáció során — más géncsoportra vonatkozóan, a gékonverziótól és transzformációtól függetlenül — leírt és tanulmányozott jelenség (SMITH 1974).

Ez a hipotézis minden eddig észlelt és a fentiekben vázolt jelenség magyarázatára alkalmas, hiszen láttuk, hogy az inl^+ magok száma eltérő mértékben, de nagyon gyorsan is lecsökkenhet, másrészt az adott klón heterokariota voltát is értelmezni tudja.

A 6 : 2-vel jellemzett, ún. konverziós tetrád, tehát nem biztos, hogy génkonverziós mechanizmussal jön létre, lehetséges, hogy a diploidizációs és hap-



6. ábra. Parciális diploid kialakulása

loidizációs folyamatok hozták létre. Hogy a genetikai transzformáció során keletkezett inl^+ tulajdonságú törzs miért hajlamos diploidizációra és/vagy génkonverzióra, annak kutatása fontos lehetne mind elméleti szempontból, mind a nemesítők számára.

Az, hogy az inl^+ gént hordozó kromoszóma miért tűnik el egyes esetekben igen gyorsan, más esetekben stabilan fennmarad inozitolon való passzáláskor is, még szintén megmagyarázhatatlan.

(Az inl^+ gén a fenti keresztezésben kétféle tetrádot hozott létre: egyrészt 4 : 4 arányban inl^+ és inl^- askospórával rendelkezőt, másrészt a génkonverziósnak nevezettet. A 4 : 4 mendeli arányt mutató askospórából származó inl^+ tulajdonságú utódokban az inl^+ tulajdonság nem labilis, inozitolon való átoltások során az inl^+ mag száma nem csökken, tehát haploid spóra.)

E kísérletek alapján levonható az a következtetés, hogy az *N. crassa*-ban ismereteink szerint, a baktériumokhoz hasonló plazmidszerű exoszóma feltételezésére nincs kellő alap.

Ennek ellenére a transzformációs kísérletek biztató lehetőséget vetnek fel eukariota rendszerbe történő DNS-bevitelre, génszétválasztásra. A kívülről bejuttatott DNS bekapcsolódik, integrálódik a recipiens genomjába, azzal együtt elszaporítható, az általa kódolt fehérje megjelenik. Szelekciós ágens jelenlétében a transzformációval létrejött új tulajdonság stabilan fenntartható. Az eukariota gén spontán vagy DNS által kiváltott megváltozása kimutathatóan eltérő szelekciós előnnyel, ill. hátránnyal rendelkező géneket (kromoszómát) hozhatnak létre, amelyek nem szelektáló körülmények között eltérő ütemben eliminálódhatnak, ill. fenn is maradhatnak.

Feltételezzük, hogy az eltérő szelekciós előnnyel, ill. hátránnyal rendelkező inl^+ törzsek inozitol szintáz enzimjeit tanulmányozva juthatnánk közelebb a jelenség megértéséhez.

Ha sikerülne az inl lokusz DNS-ét izolálni és hozzákapcsolni *in vitro* más eukariotákból származó DNS-darabokat, pl. az inzulin génjét, az inl^+ tulajdonságra szelektálva megkísérelhető lenne pl. e fehérje eukariota mikroorganizmusban való szintézise is.

A transzformációval létrehozott inl^+ gének az inl^- -szal történő keresztezésekor gyakran nem-mendeli arányokban szegregálódnak. E jelenség magyarázatára a diploidizáció és progresszív haploidizáció folyamatát tételezzük fel. A jelentős mértékben megnövekedett számú génkonverziók vagy diploidizáció indukálása hasznos elméleti és gyakorlati kutatás kiindulópontja lehet.

A további kísérletek szempontjából a következők állapíthatók meg:

A DNS-sel történő transzformáció lehetőséget adhat — elvileg szinte bármilyen kívánatos tulajdonságú törzs előállítására —, ha megfelelő szelekciós körülményt tudunk biztosítani.

A transzformáció folyamatának tanulmányozása segíthet olyan — még teljesen tisztázatlan — kérdések, mint az eukariota génszerkezet, génnagyság megismerésében, hiszen jelenleg az eukariota DNS több mint 90%-áról még azt sem tudjuk, hogy mi a funkciója.

Tanulmányozhatók a DNS integrációjában részt vevő enzimek; egy-egy enzimfunkció helyreállítása során regulációs mutánsok vizsgálatával az eukariota fehérjeszintézis szabályozásához juthatunk közelebb.

A heterokariotákban a különböző magok arányát befolyásoló szabályozó mechanizmusok, tényezők vizsgálata a multicelluláris szövetek, szervezetek fejlődésének, működésének megismeréséhez adhatnak értékes adatokat.

IRODALOM

1. ARADI, J., M. SCHABLIK, A. ZSINDELY, A. KISS, M. SZABOLCS, P. ELŐDI, G. SZABÓ: *Neurospora* Newsletter **24**, 3–4 (1977).
2. CASE, M. E., N. H. GILES: *Genetics* **49**, 529–540 (1964).
3. COYLE, M. B., T. H. PITTINGER: *Genetics* **52**, 609–625 (1965).
4. MISHRA, N. C., G. SZABÓ, E. L. TATUM: The role of RNA in reproduction and development. p. 259. Ed. Niu and Segal, North-Holland Publ. Co. Amsterdam (1973).

5. MISHRA, N. C., E. L. TATUM: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **70**, 3875—3879 (1973).
6. MITCHELL, M. B., T. H. PITTENGER, H. K. MITCHELL: *Genetics* **38**, 569—580 (1952).
7. SCHABLIK, M., A. ZSINDELY, J. ARADI, G. SZABÓ: *Neurospora Newsletter* **24**, 4—5 (1977a).
8. SCHABLIK, M., M. SZABOLCS, A. KISS, J. ARADI, A. ZSINDELY, G. SZABÓ: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **28**, 273—279 (1977b).
9. SHOCKLEY, T. E., E. L. TATUM: *Biochem. Biophys. Acta* **61**, 567—572 (1962).
10. SMITH, D. A.: *Genetics* **76**, 1—17 (1974).
11. SZABÓ, G., N. C. MISHRA, E. L. TATUM: *At the 16th Annual Meeting on Microbial Transformation. Wind River Ranch, Estes Park, Colorado* (1972).
12. SZABÓ, G., M. SCHABLIK: *Neurospora Newsletter* **20**, 27—28 (1973).
13. SZABÓ, G., M. SCHABLIK: *Neurospora Newsletter* **22**, 11—12 (1975).
14. WATSON, J. D.: *Molecular Biology of the Gene* p. 175. W. A. Benjamin, Inc. (1976).
15. ZSINDELY, A., M. SZABOLCS, J. ARADI, M. SCHABLIK, A. KISS, G. SZABÓ: *Neurospora Newsletter* **24**, 8—9 (1977a).
16. ZSINDELY, A., M. SZABOLCS, J. ARADI, M. SCHABLIK, A. KISS, G. SZABÓ: *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **28**, 281—290 (1977b).