

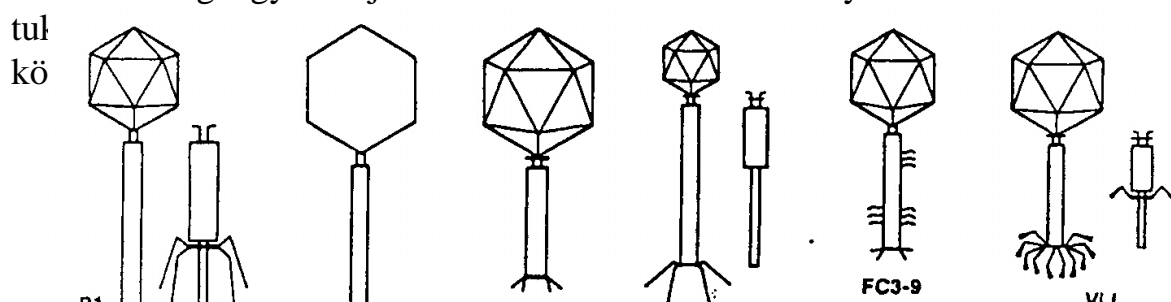
Összeállította: Szentirmai Attila emeritus egyetemi tanár

A természet minden élőhelyet betölteni képes aktivitása nem csak a magasabb rendű élőlények sejtjeit, de a prokariotákat is élőhelynek tekinti. Ezek a sejtlődők bár primitívebbek, azoknál egyszerűbb szervezetek; mégis csak a gazdaszervezet megjelenésével találták meg életterüket. A baktériumokban növekedő vírusokat egymástól függetlenül Frederick William **Twort** (Lancet 2:1241, 1915), Angliában *Staphylococcus* fajokban, Franciaországban pedig a *Shigella dysenteria* tenyésztésében Félix Hubert **d'Hérelle** (C. R. Acad. Sci. Ser. D. 165:373, 1917) fedezte fel. — A *Shigella*-tenyésztés feltisztulása után, a sejtmentesnek látzó "tenyésztéből" centrifugálással (12.000 fordulat, 30 perc) - d'Hérelle - olyan anyagot különített el, ami újabb baktérium tenyésztés lízisét okozta. A baktérium mikroszkóppal nem látható obligát parazitájának tekintett lényt, - a görög falánk φαγος szóból származtatva, - *Bacteriophageum intestinale* néven írta le (C. R. Soc. Biol. 81:1160, 1918); a velük foglalkozó tudományt pedig protobiológiának nevezte.— A teljességre törekedve megemlítendő, hogy Nikolaj **Gamaleia** 1898-ban már megfigyelt hasonló jelenséget *Bacillus anthracis* folyékony tenyésztésében, és fermentnek nevezte az ecetsavval kicsapható és ammóniával oldható, lízist okozó anyagot.

Félix Hubert d'Hérelle aktív tevékenységének hatására világszerte kutatócsoportok szerveződtek, fágkutató intézeteket alapítottak. A megindult munka eredményeként 1920 és 1940 között több mint 500 dolgozat foglalkozott ezzel a témával. Különböző forrásból (vízből, talajból, élelmiszerből, növényből és állati szervezetből) származó különböző baktériumfajokban sikerült megtalálni a prokarióták vírusait. Kiderült a nagymértékű gazdaspecifitásuk, amit Craigie és Yen a *Salmonella typhi* fágtypizálására szolgáló eljárás keretében hasznosított (Can. Publ. Health J. 29:448, 1938). — 1940-től 1956-ig 5200, 1965-ig pedig újabb 5000 dolgozat jelent meg erről a területről.

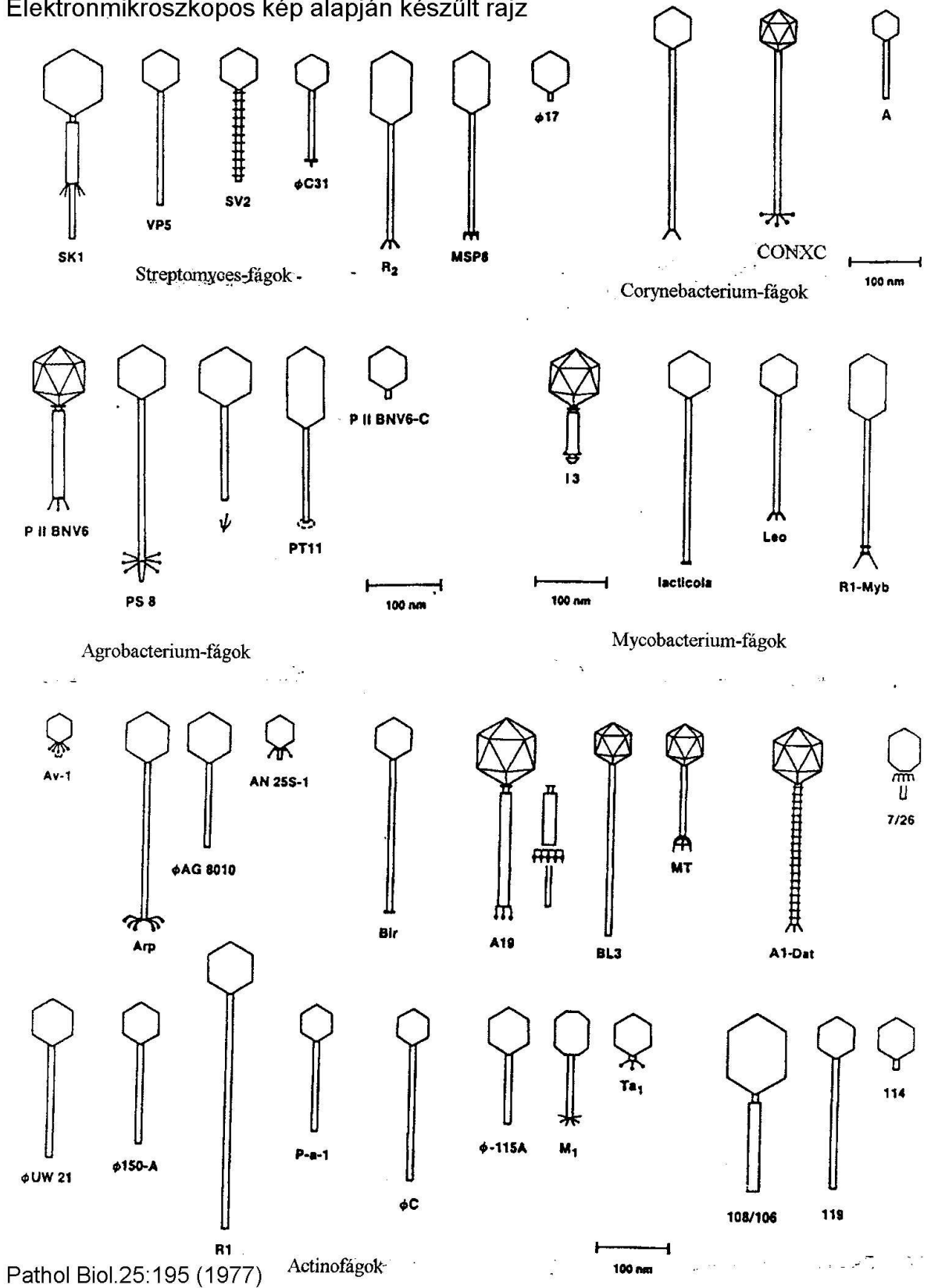
Az elektronmikroszkóp gyakorlati használatba vételéig csak élettani hatásukat vizsgálhatták, és a gazdaszervezeten kifejtett morfológiai változások alapján végezheték a kísérleti munkát. — A fágokról készült első elektronmikroszkópos felvételek csak 1940-ben jelentek meg. (Naturwissenschaften 28:45, 28:46). Tiszta formában először Schlesinger állított elő fágtenyésztet. Ebből sikerült megállapítania, hogy ez a szubmikroszkopikus szervezet dezoxiribonukleinsavból és fehérjéből épül fel (Biochem. Z. 264:6, 1933). Azt a tényt, hogy a fertőzésben csak a DNS-nek van szerepe, húsz évvel később bizonyították A. D. Hershey és M. Chase izotóppal jelzett T-2 fággal végzett vizsgálataikkal (J. Gen. Physiol. 36:39, 1952). Kísérleteikben a DNS-t foszforizotóppal, a fehérjét pedig kénizotóppal jelölve, perdöntő módon igazolták, hogy a DNS bejut a baktériumsejtbe, a fehérjefrakció viszont a sejtfalon kívül reked.

A negyvenes évektől biológiai jelentőségük megnőtt. Hamarosan a molekuláris biológia gyors fejlődésének kedvelt kísérleti anyaiává váltak. Használa-



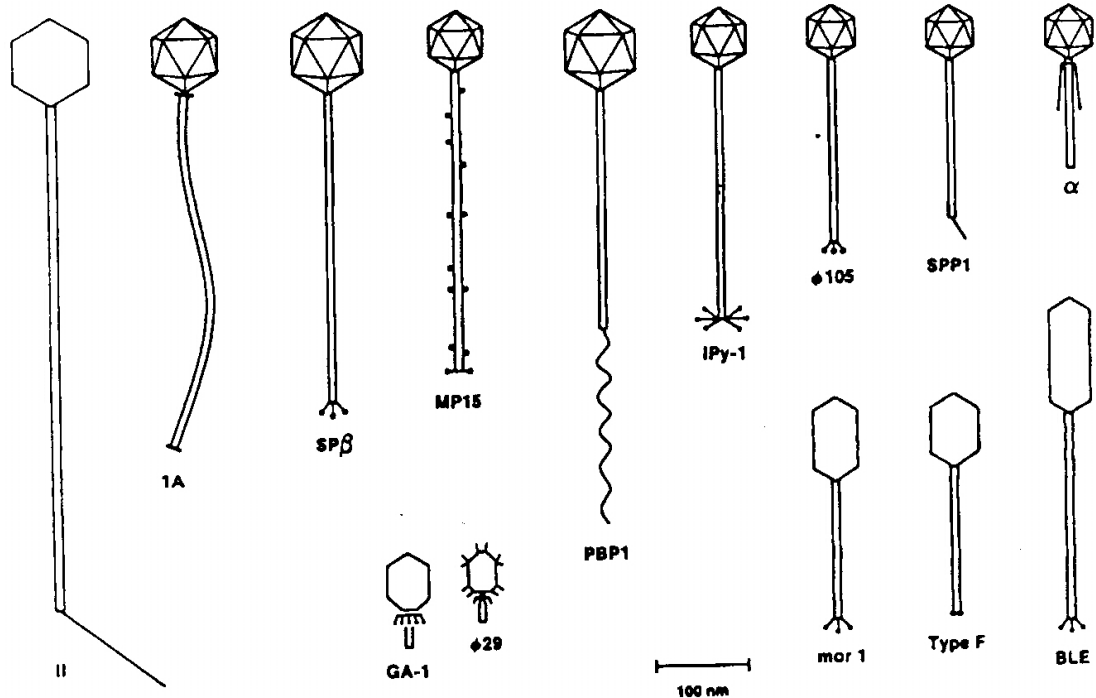
szonylag kevés számú építő elemet tartalmaznak.

Elektronmikroszkopos kép alapján készült rajz

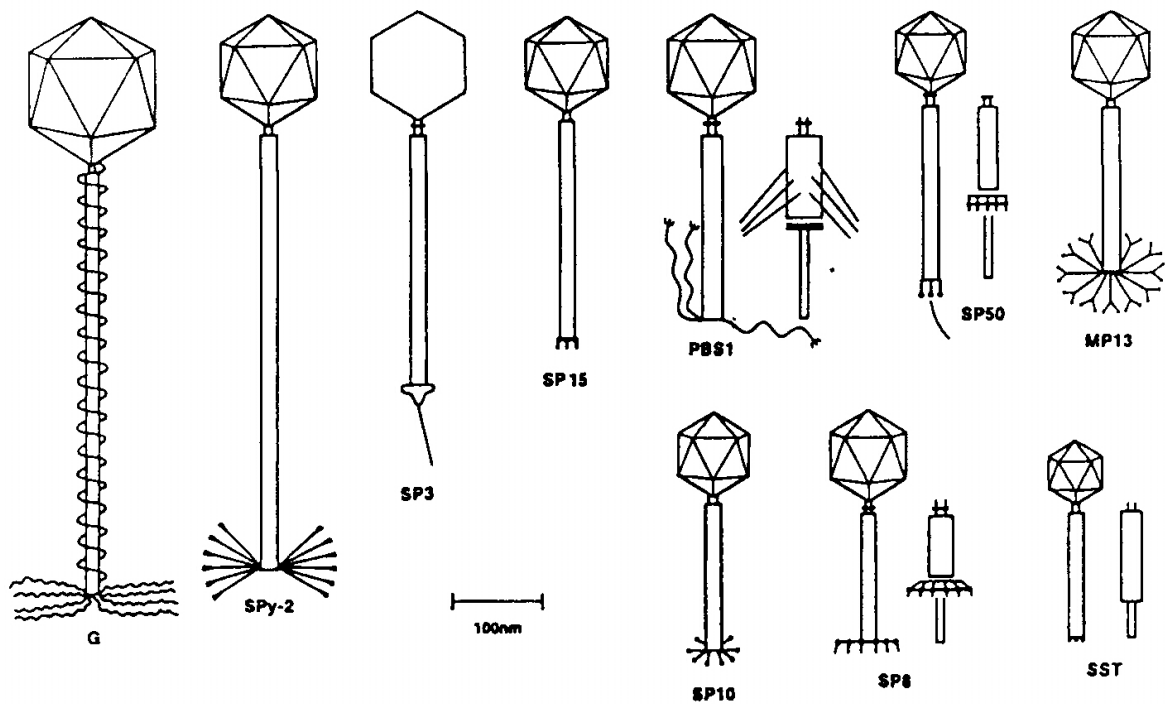


A létüket megszabó információt egyszálú vagy kettős spirál szerkezetű nukleinsav hordozza. További előnyt jelent, hogy ezen a nukleinsavmolekulán viszonylag kevés számú gén helyezkedik el. A legegyszerűbb RNS-fág mindössze három

gént tartalmaz, de a legbonyolultabb vírus génállománya sem haladja meg a háromszázat. (Elvileg előfordulhat, ezideig meg nem talált olyan vírus, amely csak egyetlen gént, a köpenyfehérje génjét tartalmazza.)

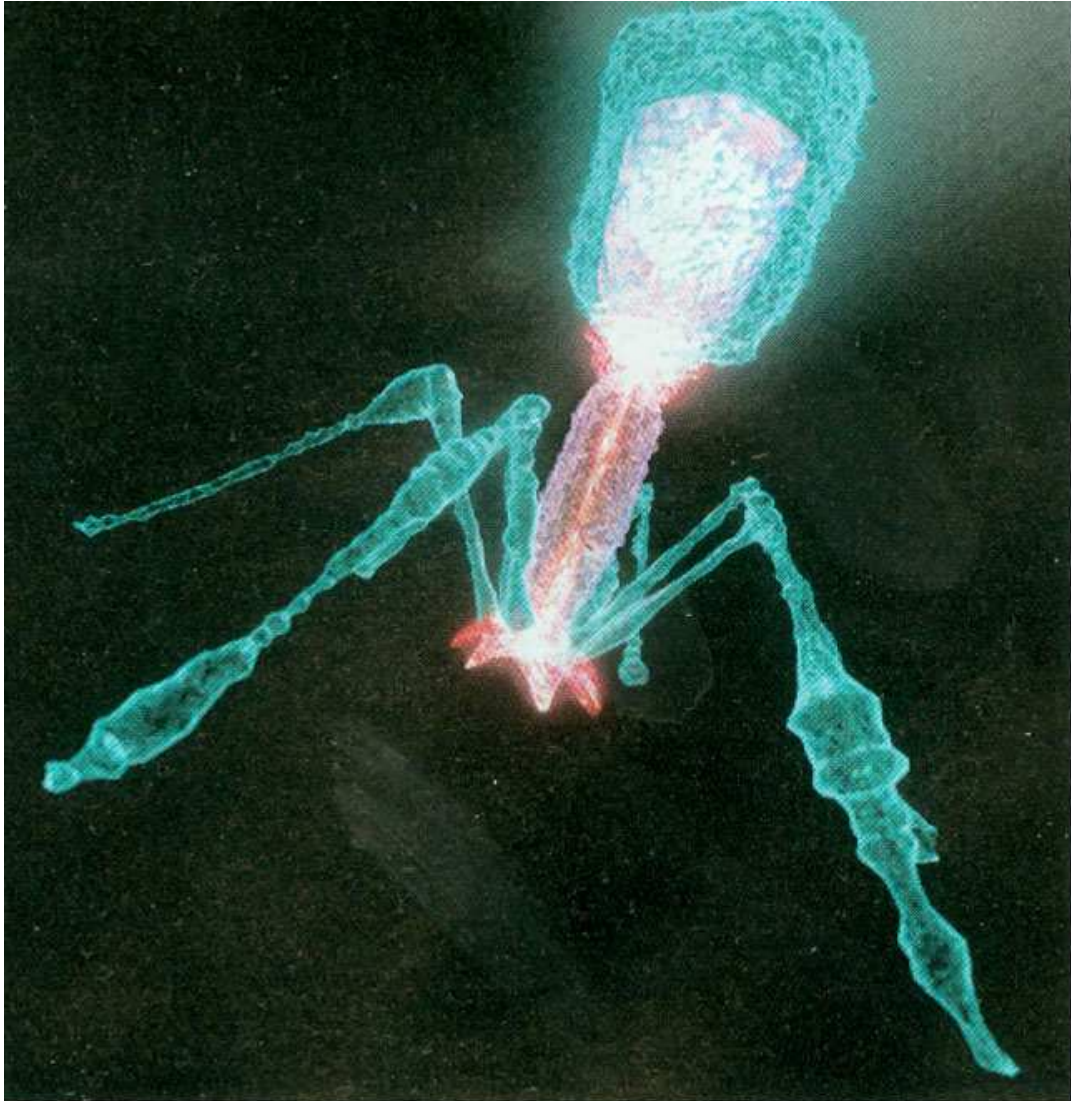


Bacillusból izolált fágok méretarányos rajza Pathol. Biol. 22:909 (1974)



Chlostridium-fágok méretarányos rajza

Intervirolgy 15:199 (1981)



**A zöld tokban (capsid) levő fehér fej
Farok rózsaszín tail
Zöld tapadó fonalak tail fibers**

ÚJ FÁG IZOLÁLÁSA ÉS AZONOSÍTÁSA

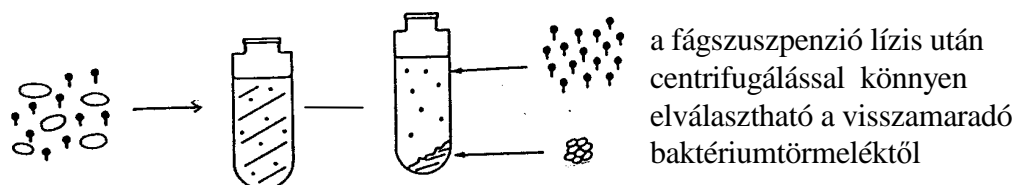
Természetes élőhelyükről (talaj, állóvíz, trágyatároló, szennyvíz) izolálhatók.

Gazdaszervezet: optimális táptalajon (húsleves) jól növekedő, virulens törzs

A folyékony táptalajon kiszabaduló fáguszuspenzióból hígítással kell homogén fágtenyészetet nyerni agar táptalajon

A jól növekedő két órás baktérium tenyészet (10^8 sejt/ml) fertőzhető az izolált fáguszuspenzióval (10^5 fág/ml) — 3 óra inkubálás után (3000 fordulat/perc) centrifugálással a gazdasejt roncsai elkülöníthetők. A felülúszóból a fág elkülönítése (15000 ford/perc) ugyancsak centrifugálással történhet. A fertőződés akadályozható kloroformmal, ami általában a fagot nem károsítja. Félórás hőkezelés viszont csiramentesíti

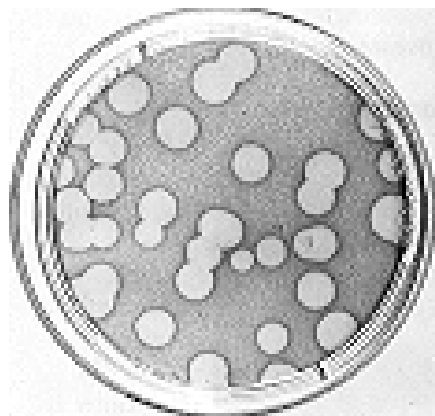
A fág tisztítása, elkülönítése



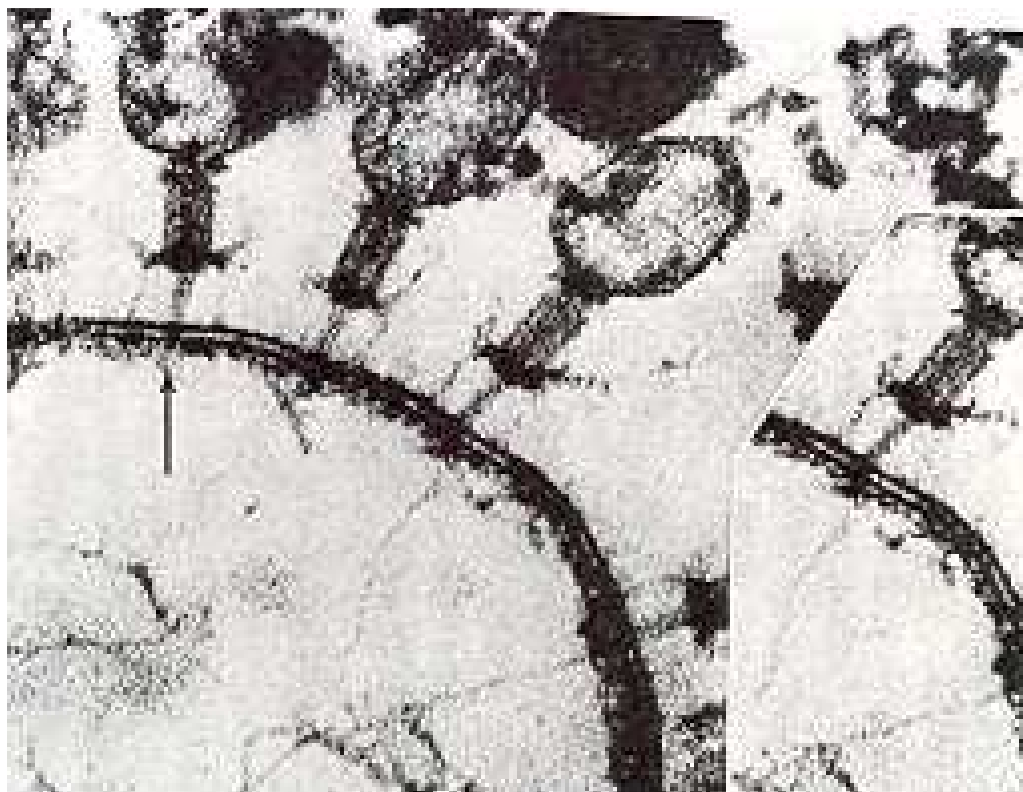
A fág elkülöníthető: ultraszűréssel (tangenciális szűrő alkalmazásával) tisztítható, frakcionálható :polietilén-glikollal (PEG 6000) A fág-titer \gggg hígított fáguszuspenzióval *in vivo* a gazdaszervezettel fertőzött agar táptalajon történik. Folyékony táptalajban: a faggal fertőzött tenyészet teljes feltisztulása észlelhető. Agar táptalajon: jellegzetes tarfoltok (plaque-forming unit: PFU) jelennek meg. Virulens fág esetén a tarfolt éles határral jelentkezik; temperált fág általában elmosódott szélű foltként hívja fel magára a figyelmet. — Homályos tarfolt képződik a nyálkát termelő baktérium esetében. A tarfoltról a fág platina-kacccsal gazdaszervezettel fertőzött agartáptalajra átoltható.

A tiszta virulens fág: vizes szuszpenzióként $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on akár 10 évig is tárolható, de a gazdatörzs spóráiban is fennmarad (Liofilezés, folyékony nitrogénben való tárolás viszont csökkentheti a fág életképességét.)

Tarfolt
PFU



A FÁGSZAPORODÁS BIOLÓGIAI TÖRTÉNESEI



A fág adszorbcója, a fágreceptorhoz való kötődés

Fágreceptor lehet a baktériumsejtből kinyerhető, a külső membrán valamelyik tisztított formában előállítható fehérjeje; a lipoprotein alapváza; a peptidoglikán-teichoinsav komplex; a baktérium tokanyaga; a mikoplazmákban a sejtmembrán valamelyik alkotórésze; extracelluláris nyúlványok, ostor vagy pilus. Az utóbbi esetben csak az F^+ sejtekhez kötődhet, csak a donor sejtek fertőzésére képes.

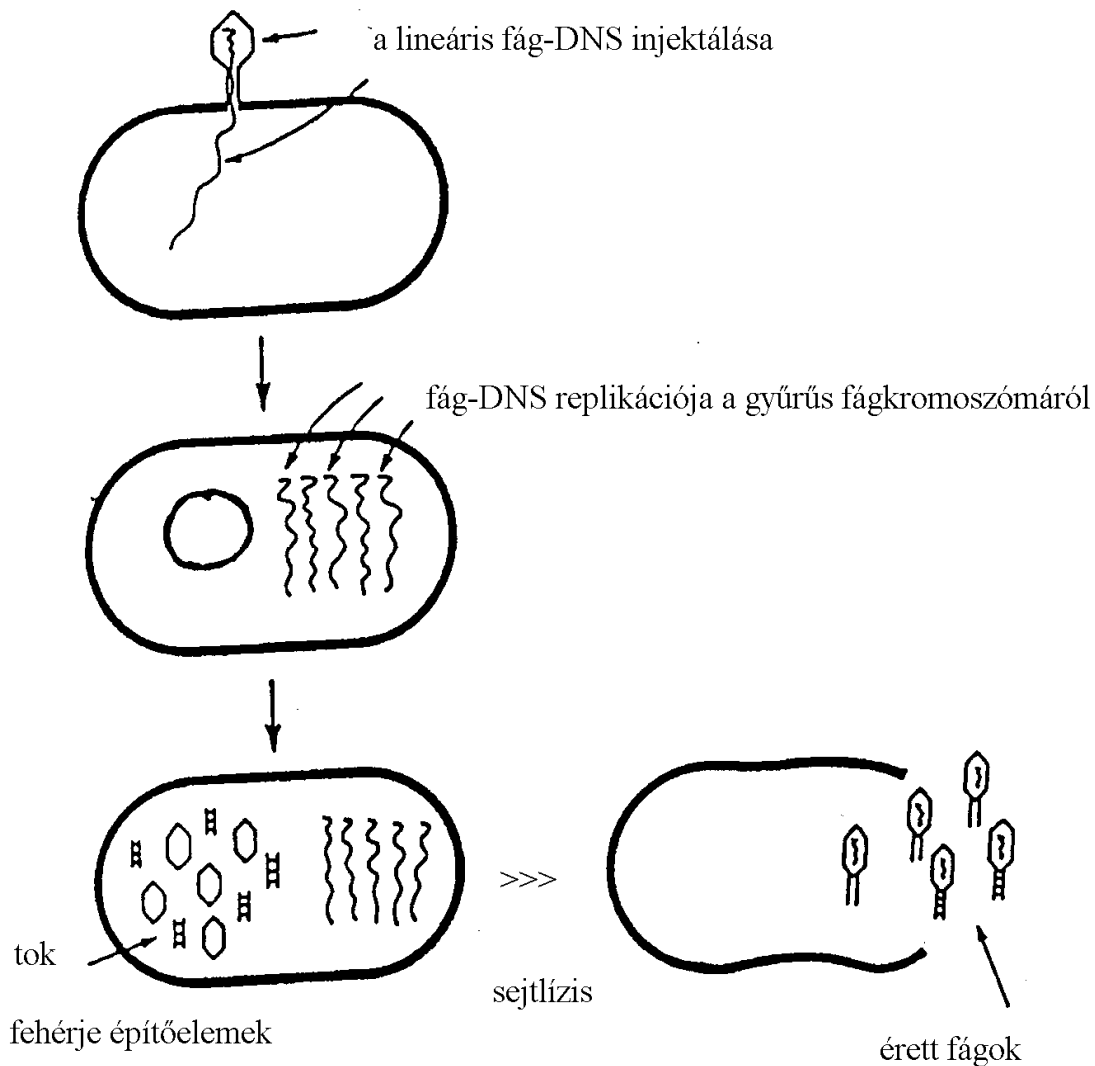
Egyetlen sejten több különböző receptor is előfordulhat, tehát különböző fágok is fertőzhetik a gazdaszervezetet, egyidejűleg azonban csak egy faggal fertőződhet a mikroszervezet.

A T-páros fágok kötődése két lépésben történik;

1) a farok végén levő szőrök lazán, reverzibilisen kötődnek a receptorhoz.
2) ezt követi a farok összehúzódása, és a nyaki kötőelemek kapcsolódása, amely hőfokfüggő, irreverzibilis kötődést jelent. A Ca és a Mg ionok (0,001-0,01 M) elősegítik a fágadszorbciót, de befolyásolja a kötődést a pH, az ionerősség, a tápközeg összetétele. A fágok 90 %-a 10 percen belül adszorbeálódik. A kötődés sebessége a koncentráció viszonyoktól függ, és az idővel exponenciálisan csökken. — T-fágoknál a farokfehérje alegységek konformációs változása segíti az injektálást (alkohol, formalin, hidrogénperoxid, karbamid, stb befolyásolja), de a fehérje örökletes megváltozása is akadályozhatja a folyamatot A kötődést a recep-

tor szerkezetének örökletes változása akadályozza, rezisztenciát okozhat. A rezisztens törzs ellen azonban hatásos fág izolálható ill. előállítható (1950-ben A. Lwoff helytelenül immunisnak nevezte a rezisztens prokariótát)

A fágkromoszóma minden esetben lineáris formában jut át a citoplazma membránján. Működőképessége azonban a gyűrűs formához kötött.



A fág szaporodása már a látencia periódus alatt megindul.

A látencia periódus az első érett fág megjelenéséig mérhető időtartam, amelynek hossza a gazdaszervezet élettani viszonyaitól függ. A gyorsan növekedő baktériumok esetében (*Rhizobium*, *Vibrio*) ez a folyamat 20 percig sem tart, de a cianobaktériumok esetében 5-20 óra között változhat. A fertőzött sejt teljes anyagcsererendszere a fág szaporodás biokémiai igényeinek a kielégítésére módosul. Ebben a szakaszban a fág kialakulásához szükséges olyan enzimek képződnek, amelyeknek a génjeit a fágkromoszóma tartalmazza. Az enzimek létrehozzák – a szükséges arányban és mennyiségben – a fág részecske építőelemeit, ezért ebben a szakaszban intenzív RNS és a fehérje-szintézis tapasztalható.

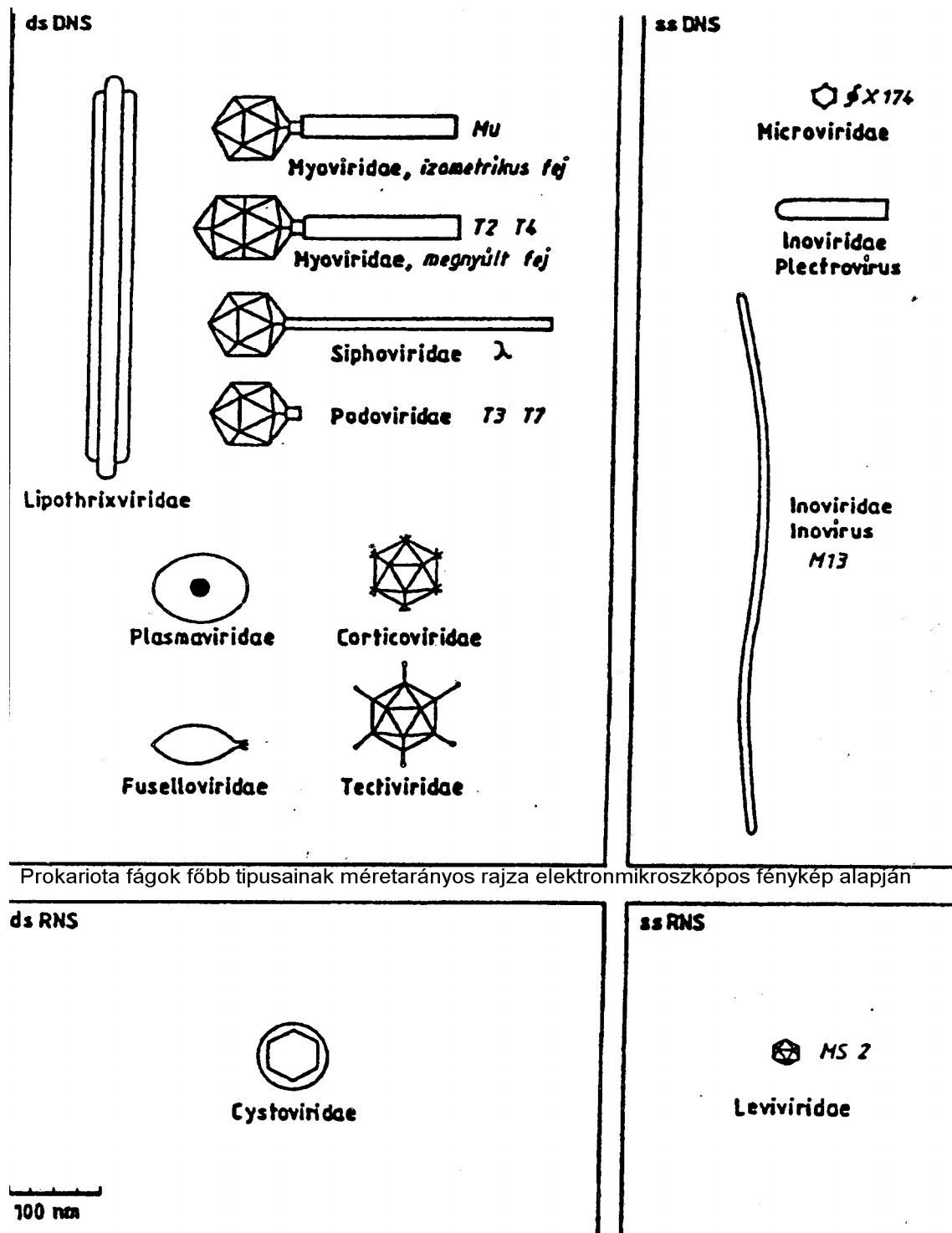
Mindent megelőz azonban a fágkromoszóma képződés. Az információ szabályozottan, megfelelő sorrendben kerül leolvasásra. Zavar esetén éretlen fágok, fágreszecskek megjelenése figyelhető meg. (félig kész fágok a gazdasejt kémiaiag kiváltott lízisével is nyerhetők) A szabályozás egyik módja, amikor új RNS-polimeráz képes hasznosítani az eddig le nem olvasott információt. Sok esetben új σ -faktor teszi lehetővé az eddig le nem olvasott gének átírását

A gazdasejt lízise a befejező szakasz, az érett fágok megjelenése a tenyészközegben. A kiszabaduló fágok száma széles határok között változhat, ami a T-1 fág esetében 20-1000, a Leviviridae (RNS-fág) esetében 500-10.000 között változhat

Vegetatív formában a vírus eredetű nukleinsav (RNS vagy DNS) a gazdaszervezet enzimszisztémáját igénybevéve nagy számú fertőzőképes részecske képződését irányítja. A vírus-nukleinsav olyan domináns gének láncolatának tekinthető, amely a gazdasejt génállományát elnyomva, a vírus parazita jellegét kódolja. A vírus fertőzést nem követi szükségszerűen a károsított gazdasejt pusztulása. (Inoviridae) A fertőzőképes virion olyan életjelenség nélküli (vizes szuszpenzió formájában évtizedekig tárolható) szerves kristálynak tekinthető, amelyben az új virion felépítéséhez szükséges genetikai információt tartalmazó nukleinsavat fehérje burok veszi körül. (Bakteriofágok) Sok esetben egy második burok fokozza a virion védelmét. (Tectiviridae, Corticoviridae, Cystoviridae.) Más esetben a vegetatív alakban való átmenethez szükséges enzimek génjét is tartalmazza az örökítő anyag (A lizogén tulajdonságot okozó temperált fágok)

A **bakteriofágok rendszerezése** az örökítő anyag illetve a morfológiai jellemzők alapján történik. Így dupla szálú ds DNS és egyetlen fonalból álló (szimpla szálú) ss DNS szerint csoportosíthatjuk. Az örökítő anyagként ribonukleinsavat tartalmazó fágokat pedig a kettős szálú ds RNS, illetve a szimpla szálú ss RNS tartalmuk alapján különíthetjük el. Az egyes csoportokban előforduló fajok száma széles határok között változhat. Amíg a Cystoviridae család egyetlen képviselője ismert, addig a Syphoviridae családban több mint 1200 fajt tartanak nyilván. Elmosódott a határ a burokkal rendelkező kettős szálú DNS

tartalmú temperált fágok és a burok nélkül előforduló dupla szálú DNS örökítő anyaggal rendelkező plazmidok (episzómák) esetében. Mindkettő képes a baktérium-kromoszómába integrálódni, de gyűrűs alakban is szaporodóképesek..



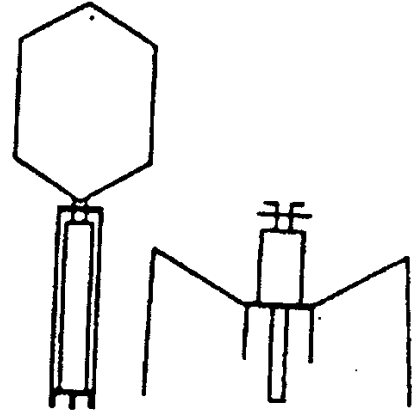
Prokariota fágok főbb típusainak méretarányos rajza elektronmikroszkópos fénykép alapján

A FONTOSABB FÁGCSALÁDOK ISMERTETÉSE

MYOVIRIDAE μυος izom (T-páros fágok)

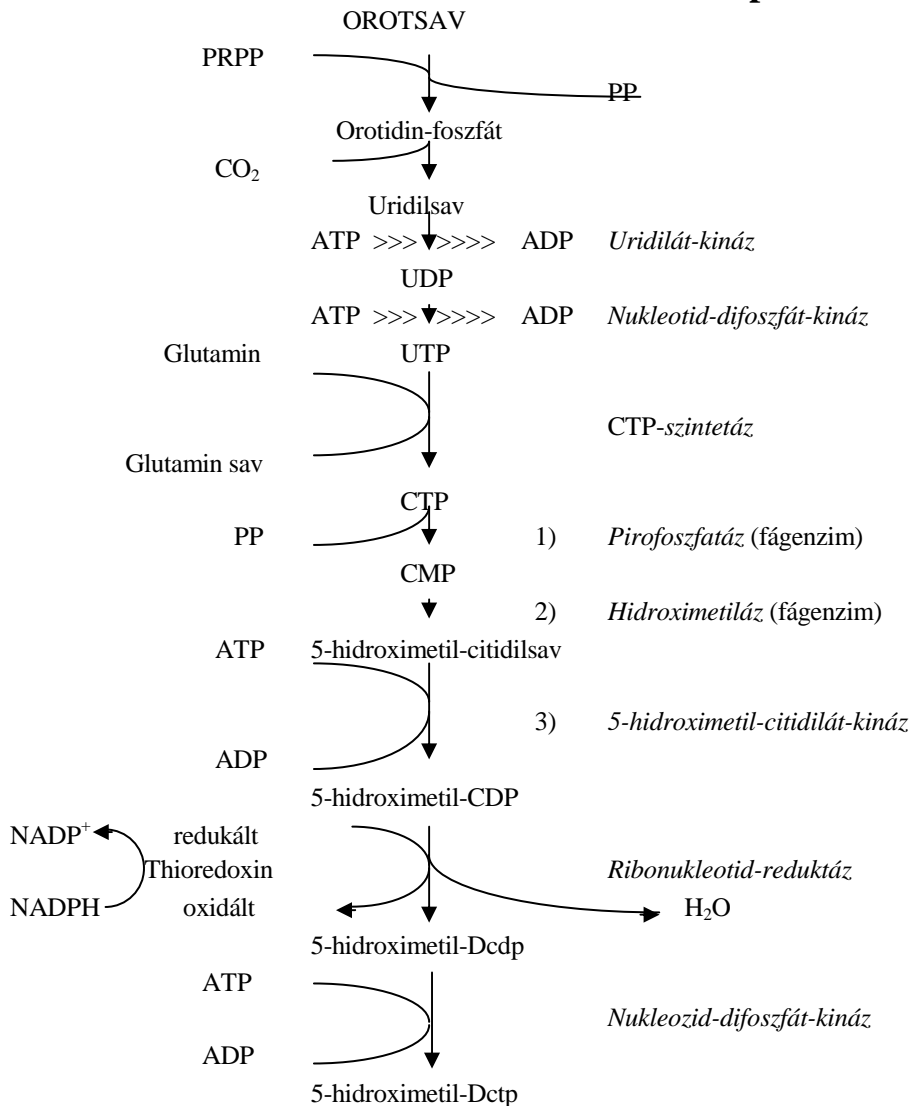
250 mDa méretű fehérjéből felépülő fej
120 mDa méretű kettős szálú DNS-ből álló,
lineáris fágkromoszóma, (200 gén)

A farokrészen megtapadásra szolgáló képletek és a fág-DNS szálnak a gazdaszervezetbe jutását segítő fehérjék találhatóak, amelyek elősegítik a nyaki kötőelemek tapadását és a kromoszóma membránon való áthaladását lineáris formában.

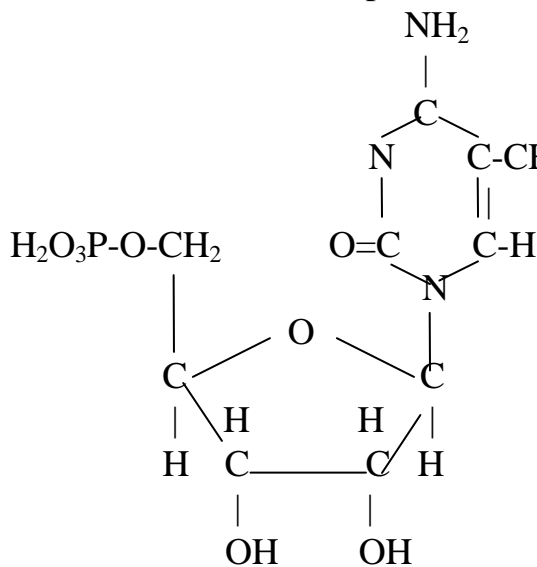


A fág-DNS a gazda számára biokémiaiilag oly mértékben idegen, hogy a védő feladatot, a hibás DNS lebontását végző nukleázok tehetetlenné válnak. A fág-DNS pl. citozin helyett 5-hidroximetil-citozint tartalmaz. A fágkromoszómát pedig glükóz molekulák borítják.

Hidroximetil-citozin-trifoszfát képződése



A hidroximetil-citozin képződését katalizáló enzimeket kódoló gének átírása a

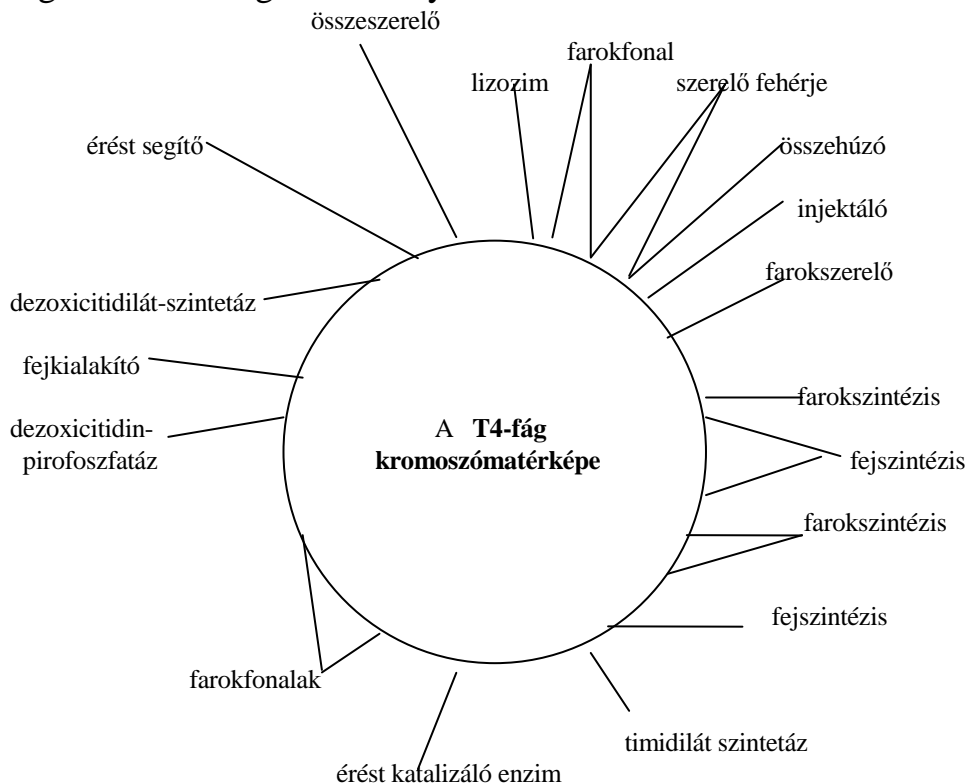


gazdaszervezet számára új fel adatként jelentkezik

- 1) a *pirofoszfátáz* citidil-trifoszfátból citidilsavat képez.
- 2) a *hidroximetiláz* hidroximetilezi a citidilsavat
- 3) *5-hidroximetil-citidilát-kináz* készíti az 5-hidroximetil-citozin-difoszfátot amiből a *ribonukleotid-reduktáz* alakítja ki a dezoxi-származékot, amelyből a *difoszfátkináz* segítségével készül a fágkromoszómához szükséges dCTP

5-hidroximetil-citidilsav

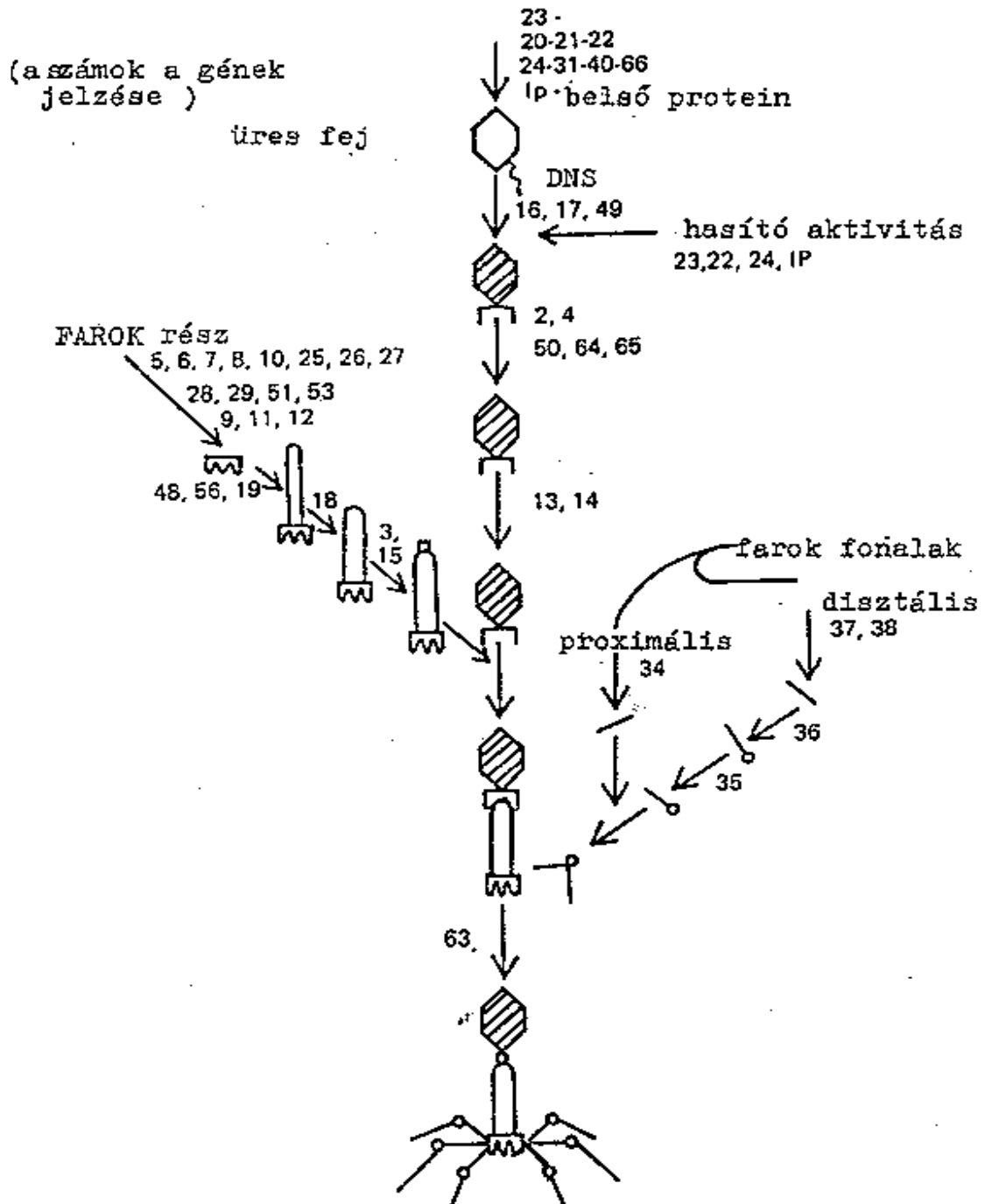
A glikozilezést UDP-glükóz felhasználásával fágspecifikus enzim végzi. A többszörösen védett fágkromoszómát a jelenlevő nukleázok nem károsítják. A gazdaszervezet RNS-polimeráza megkezdi a fertőző DNS-ről a mRNS átírását. A fágspecifikus enzim, hatástalanítja, akadályozza a kromoszóma replikációját. A sejt biokémiai aktivitása teljes mértékben a fág-DNS replikációjára és a fágkromoszóma génállományának az átírására használandó fel.



Egy-egy *Escherichia coli* K-12 sejtéből a húsz perces igénylő szaporodási ciklus végén 200-2000 virulens fág szabadul ki

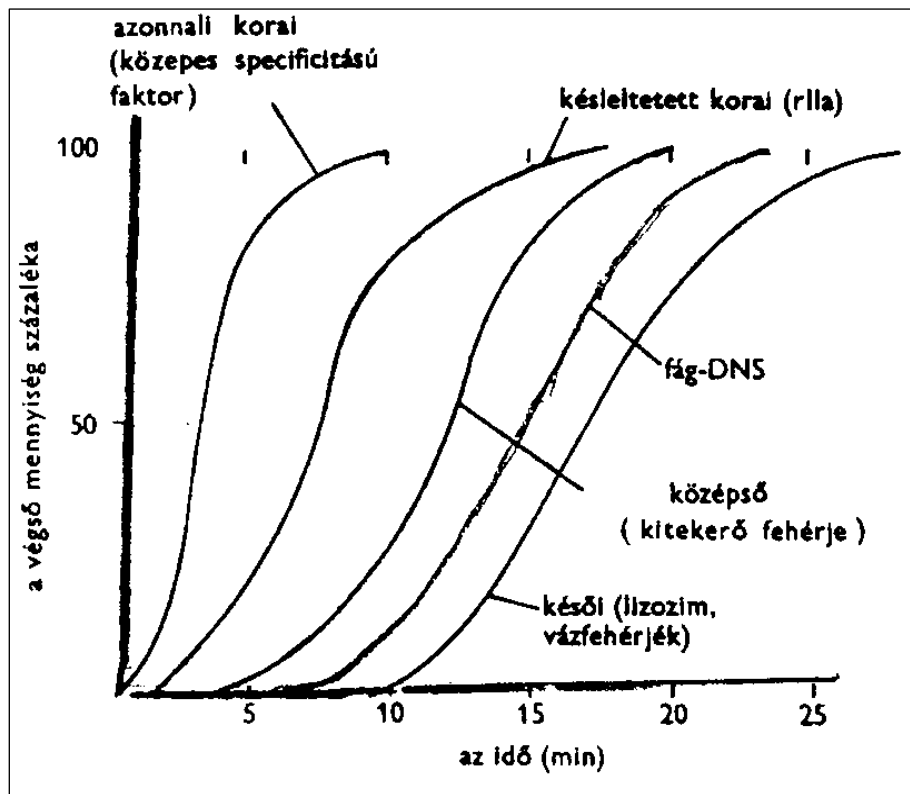
- A fágkromoszóma átírandó elemei
- A) a fejrészt burkoló fehérjemolekulák,
 - B) a farokrész elemei,
 - C) az építőelemeket összeillesztő enzimek
 - D) a lizozim gén átírása és kifejezése

A T-4 fág építőelemeinek a képződése, az eddig ismert gének számjelzéseivel.



T-4 fág építőelemeinek szerveződése

A fágkromoszóma génállomány határozott program szerint kerül átírásra



A szabályozó fehérjék hatása a fág fejlődésére

Többszörös replikációs villa kialakulása segíti a nagyszámú másolat közel egyidejű elkészültét. A műveletet a korai fázisban készülő nagyszámú iniciáló fehérje képződése indítja el. A fág-DNS replikációját minden esetben rövid láncú RNS-molekulák indítják. Egyes gének a teljes ciklus alatt működnek, mások csak a ciklus meghatározott időszakában dolgoznak. (A lizozim korai megjelenése például a populáció pusztulását jelentené.) A represszorral történő szabályozás helyett, pozitív szabályozás valósul meg. A gazdaszervezet RNS-polimeráza és σ -faktora ugyanis csak a korai stádiumban szintetizálódó fehérjék génjeinek a promotereihöz képes illeszkedni (25 fehérje). Az átírás az első stopjelnél megáll, az RNS-polimeráz pedig újra kezdi a számára szabad gének átírását. Öt-tíz perc elteltével képződő fehérje a bakteriális σ -faktort lecserélve az RNS-polimerázt azoknak a promotereknek a felismerésére is alkalmassá teszi, amelyek a fágérés folyamatának a későbbi szakaszában nélkülözhetetlen gének átírását indítják.

A korai szakasz promoterei által irányított gének az óra járásával ellenkező irányban, a késői promoterek által irányított gének pedig az óra járásával egyező irányban íródnak át.

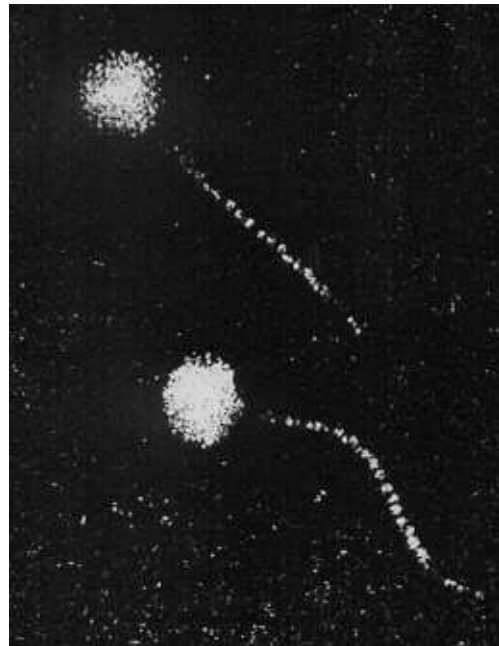
SIPHOVIRIDAE σιφών cső (Sendai előtt 1984-ig Styloviridae)



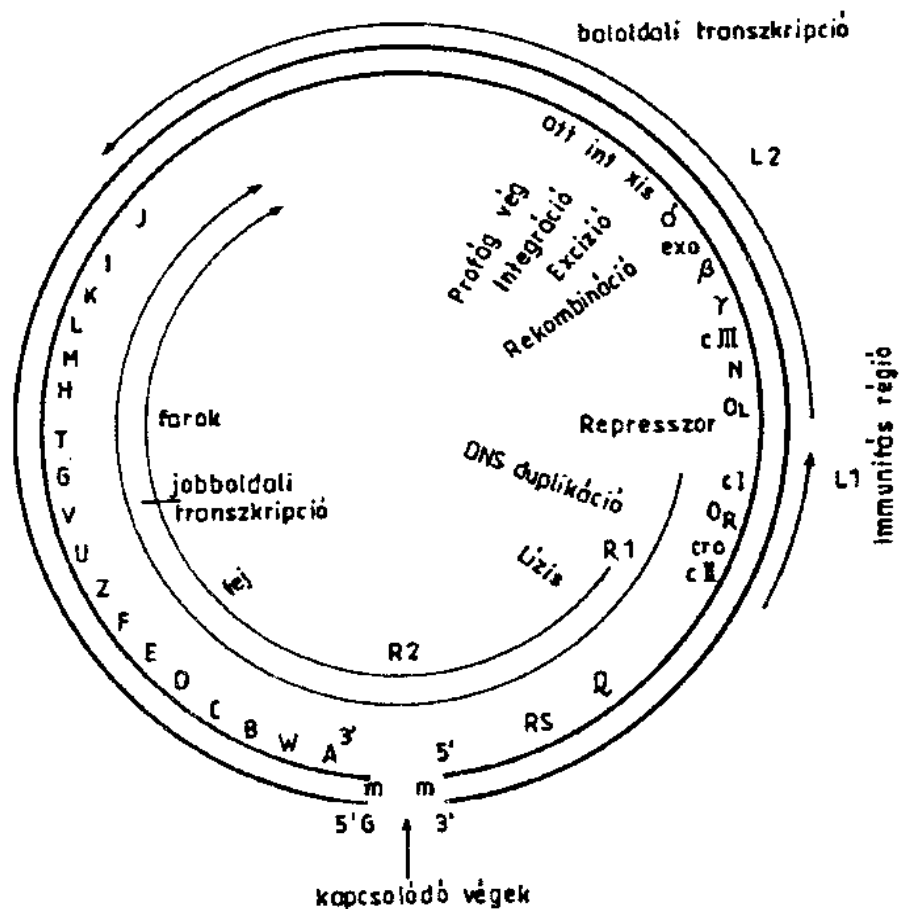
nyakrész nélküli hosszú farokkal rendelkező DNS-fágok; a farok a megtapadásban és a fágfejben lévő 14,5 μm méretű kétszálú DNS bevezetésében játszik szerepet.

a **temperált fágok** legismertebb faja, a λ-fág, – Hosszú ideig képesek a gazdaszervezetben profágként fennmaradni.

A vegetatív ciklus alatt a gazda kromozómájába integrálódva, azzal együtt replikálódva őrzik a gazda lizogén tulajdonságát.

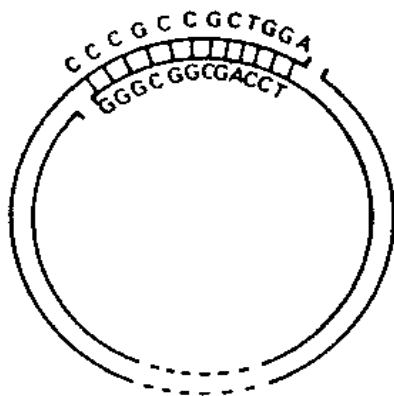


A lizogén baktérium érzékeny marad más baktériumfágra, de azonos típusú virulens fággal nem fertőződik. A lizogenitás tényét a prokarioták esetében – (ideértve a cianobaktériumokat és a hőtűrő ősbaktériumokat)–sok kutató megfigyelte.



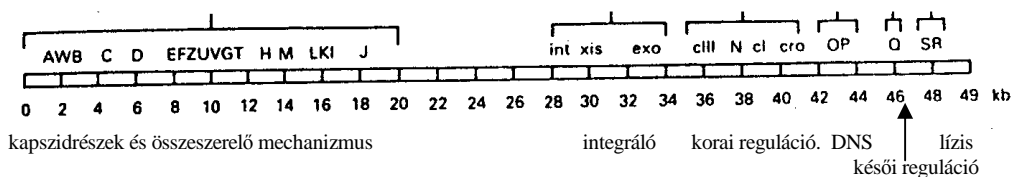
A lambda-fág géntérképe

a fark fehérjemolekuláit kódolják. Befejezésül a lízist okozó enzimek génjei kerülnek átírásra. A gazdaszervezet RNS-polimerázának a továbbhaladását a megfelelő helyen található terminációs jelek akadályozzák. A gátlás feloldására külön fehérje, az úgynevezett antiterminációs faktor szolgál. Ennek a fehérjének a kódja a terminációs jelek előtt, a korai fázisban átíródó gének között található. A korai gének átírása az óra járásával ellenkező, a késői gének azzal egyező irányban történik. Utolsó lépésként a gazdaszervezet lízisével kiszabadulnak az új gazdát kereső temperált fágok.

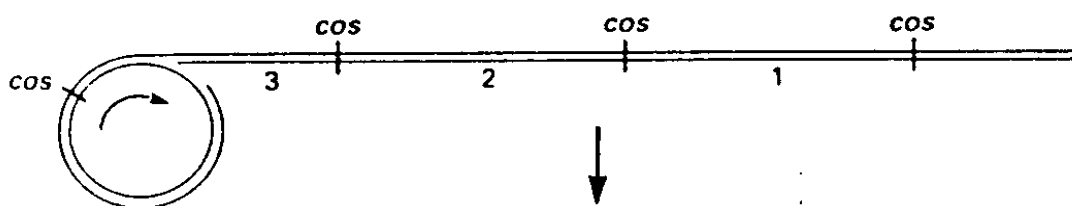


Att
A λ -fág gyűrűs formában

Az integrálódott fágnek a baktériumkromoszómából való kiválása után az átmenetileg lineáris formában lévő fágkromoszóma szabad végei kapcsolódnak és a kialakuló gyűrűs alak lehetővé teszi a lizogén életciklus megindulását, a fág-DNS replikációját. A gyűrűs alakról folyamatosan legördülő duplaszálú DNS egymást követően lineáris formában tartalmazza a fágkromoszóma génállományát. Az A-géneken kódolt endonukleáz a cos (cohesive ends) ragadós szakasz határán feldarabolja a folyamatosan képződő DNS-t.

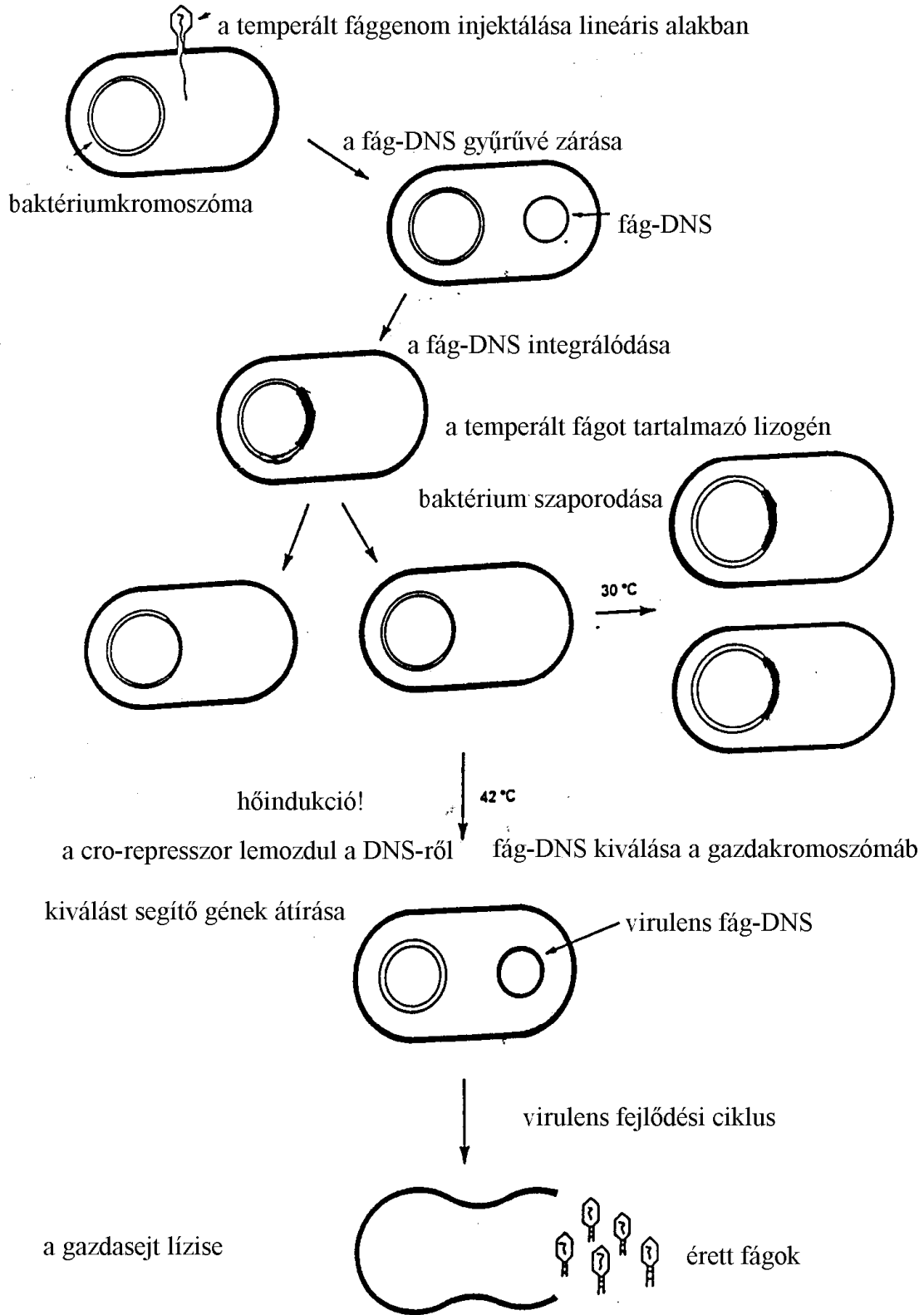


A képződő λ -fág térképe lineáris formában



λ -DNS replikációja *Escherichia coli* K-12 törzsben

A folyamatosan képződő fágépítő-elemekből készül az érett fág, amely lineáris formában tartalmazza a fággenomot. Ennek eredményeként hamarosan nagy mennyiségű fág kerül a környezetbe, amely újabb *E. coli* sejt fertőzésére képes. A profág kiválása spontán is bekövetkezhet mintegy ezrelékes nagyságrendben. Ezért nem éles az agár lemezen a temperált fág okozta sejtmentes terület határa. De ilyen folyamatot indíthat el bármilyen hatás, például egy celluláris proteáz is inaktiválhatja a represszort. Ez a folyamat provokálható kémiai, illetve fizikai hatással. Ez változhat; az Mu és a P2 temperált fág például nem indukálható UV-vel.



A hőérzékeny temperált fággal (λ -fág) lizogénné váló *Escherichia coli* K-12 fejlődése 30 °C, illetve 42°C-on.

A géntechnológiai munkáknál előnyösen használható a 10-12 μm hosszú készülő, helikális DNS-t tartalmazó **P-2 temperált fág**.

A fertőzési folyamat közben a lineáris szerkezetű fág-DNS ragadós (redundáns) végei miatt könnyen vehet fel gyűrűs szerkezetet, amely a λ-fághoz hasonló módon képes a gazdasejtbe épülni azzal az eltéréssel, hogy nem csak a fágkromoszómán találunk több kapcsolódási helyet (Att), de a gazdaszervezet (*E. coli K-12*) kromoszómáján is több kapcsolódási hely (IS) található.

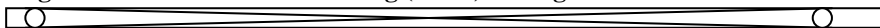
Géntechnológiai alkalmazását könnyíti, hogy a fágfej építőelemeinek jelenlétében nem csak a fág-genom, de a fágkromoszómával közel azonos méretű idegen DNS (a gazdaszervezet kromoszómájának restriktív enzimekkel kivágott szakasza) is képes résztvenni a pakolás folyamatában. A génteljesítéshez ideális eszközként használható, mivel a fágfejbe a baktériumkromoszóma akár 2 %-a is bezáródhat. — A prokariota génteljesítését segíti, hogy a fágkromoszómán a bakteriális DNS fragmentálódását elősegítő nukleáz is kódolva van. Vektorként használható teljes plazmid is bepakolható a fágokba, ha a mérete közel azonos a fágkromoszómával. — Ezek a fágmorfológiát mutató részecskék a megtámadott sejtéből kiszabadulva, mint valami kamikaze-torpedó, a fejben lévő DNS darabot az új gazdába juttatják, anélkül, hogy a gazdasejt lízisét okoznák.

A Mu-fág (mutator) a mutációt indukáló tulajdonsága miatt említendő.

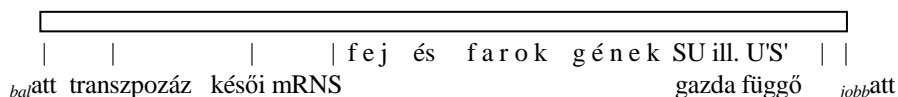
A fertőzést követően a C gén által termelődő represszor akadályozza a lízist okozó gének átírását. Különböző génekbe épülve az éppen támadott gén működését akadályozza. Természetes mutagénként a gazdasejtéből egyszerű szelekciós módszerekkel különböző mutánsokat nyerhetünk.

Az eddig megismert temperált fágok csak a kromoszóma kiválságos IS helyére épülhettek be. A Mu fágban levő transzpozáz viszont ragadós véget létrehozva és duplikációt végezve a legkülönbözőbb helyeken ad lehetőséget a fág beépülésére. A 6 farok fonalat és injektáló elemet működtető fág 37,2 kb méretű genomja a gazdasejtbe nem sokkal a fertőzés után a fágban kódolt transzpozáz enzimkomplex által nyitott részbe képes elhelyezkedni. — A fág hívatlan vendégként különböző gének törlését katalizálhatja, A fágfejben azonban általában ennél nagyobb (39 kb) — az előző gazda DNS állományából hozott DNS szakasz kerül. A bal oldali csatlakozási ponthoz 100–150 bázispár, a jobb oldalhoz 1-2 kb, vagy néha ennél nagyobb szakasz is kapcsolódhat.

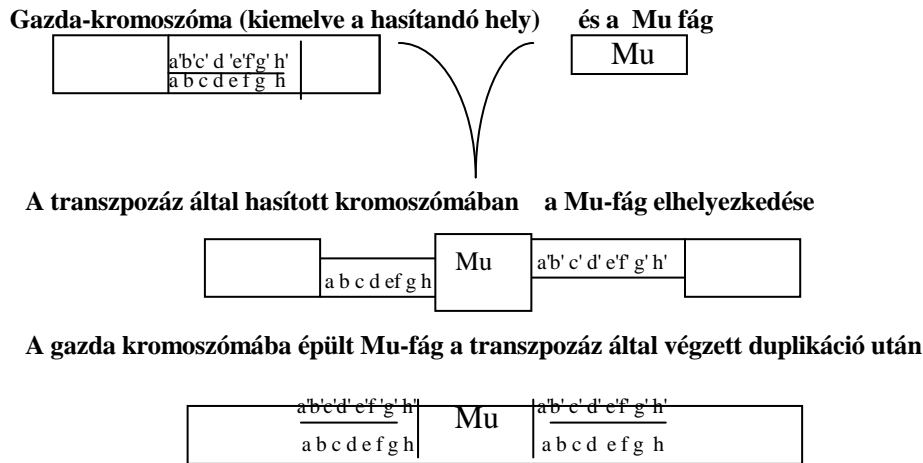
A gazdaszervezetbe kerülő Mu-fág (39 kb) az idegenből hozott szekvenciákkal együtt



A gazda kromoszómába épülő (37 kb méretű) Mu genom



A gazdaspecificitást a fág genom jobb oldalán található SU szakasz pozíciója határozza meg. Pozitív esetben a farok fonalak szerkezete a *K-12 E.coli*-val kialakítandó kapcsolatot előnyben részesíti. Ha ez a szakasz fordított helyzetben (U'S') található, akkor más enterobacter törzsek fertőzése várható.



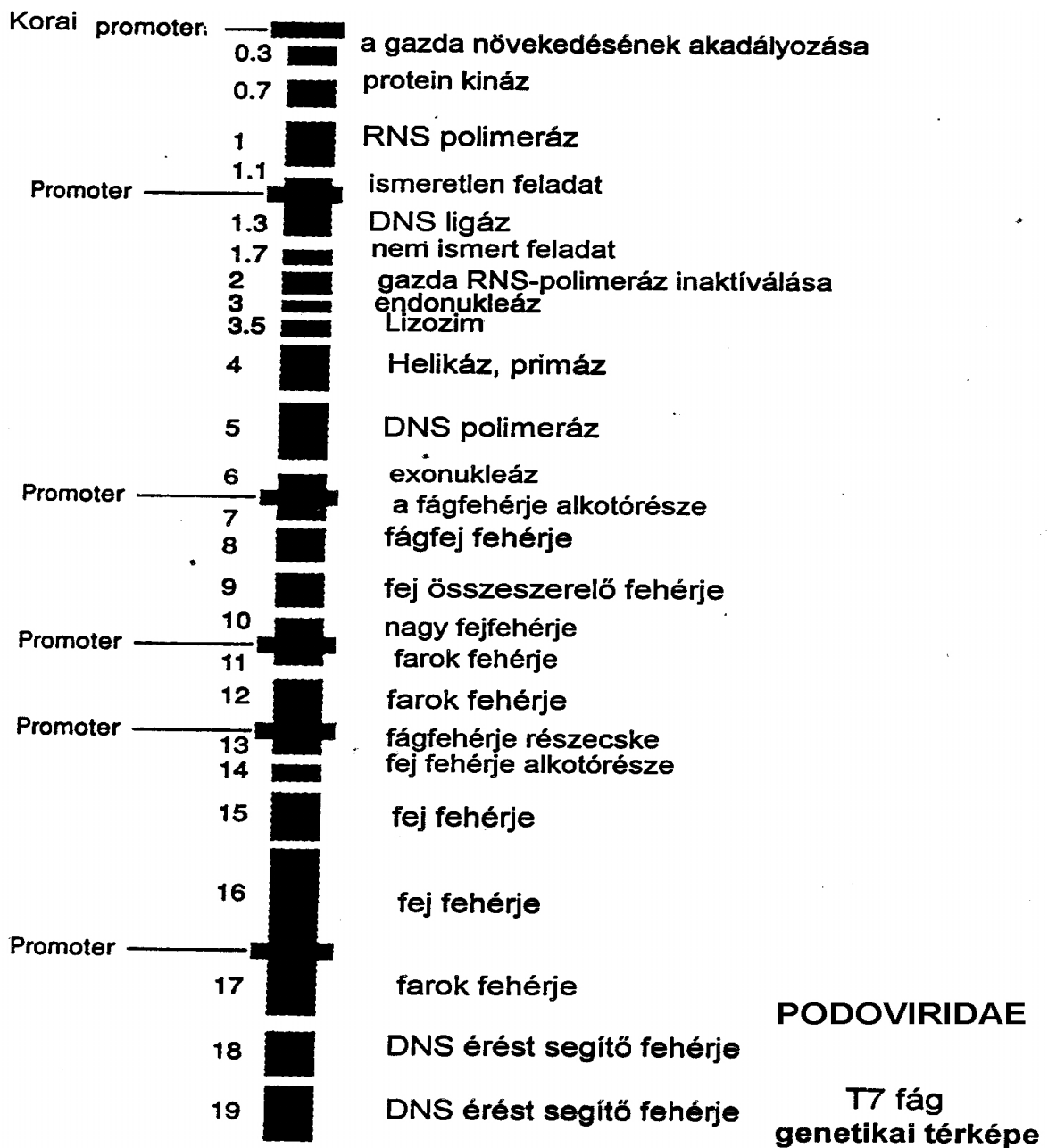
A Mu-fág szerkezete és beépülése a gazda kromoszómába

A fág kromoszóma védett, mivel az adenil tartalom 15 %-a acetamidálva van. A lineáris fág-genom (integrálódó szakasz) megszabadul a hozott szakaszoktól. Az átíródozó transzpozáz fehérje készíti az integrálódás ferde hasítékát, majd a Mu elhelyezkedése után az egyszálú DNS darabokat kiegészíti. Ha nem esszenciális ponton történt a beépülés, akkor a szaporodása nem áll le. a fág hosszabb-rövidebb azonos szekvenciájú szakaszok közé ékelődve található. Az egyenes att vég lehetőséget ad a fág egyszerű kilépésére és a szaporodás szempontjából szükséges gyűrűs alak létrejöttéhez. Az építőelemek elkészültével indul a késői mRNS szintézise, a lítikus ciklusban érdekelt gének átírása és a fág bepakolása, továbbá a beékelődéssel szomszédos gént hordozó fág kiszabadulása. Ez a fág felismeri a megfelelő hasítási helyet az átalakítandó kromoszómán. Ez a szakasz nagy méretű is lehet (40-1000 b). Egy szálú fonalképződése közben (ferdén) hasít és az egyszálú fonalak végződéséhez elhelyezi a fág att. végződéseit. Elvégzi az egyszálú DNS szálak komplementálását (duplikációt). A hasítási hely károsításával nagy számban különböző mutánsokat állít elő. (A géntechnológus által használt transzpozon a Mu fág transzpozáz génjének a funkcióját látja el.)

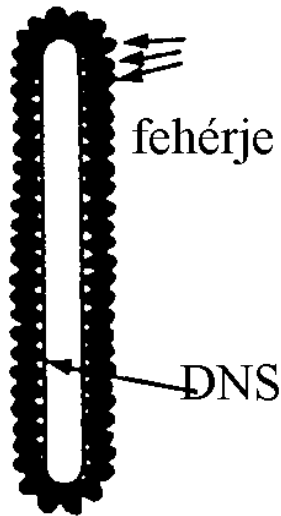
PODOVIRIDAE ποδοα láb. A T-páratlan fágok ismert képviselője a T-7 fág.



A késői szakasz átírására saját RNS polimeráz készül, A 12 μm hosszú és 25 mDa méretű kettős hélix. mindössze 30 gént tartalmaz, amelynek géntérképe jól ismert. A gazdaszervezet RNS-polimeráza írja át az első öt gént, amely a gazdaszervezet RNS-szintézisét leállító fehérjéken kívül a fág RNS-polimeráz szintézisét irányító információt is tartalmazza. Ebből a gazdaszervezetben működő ribonukleáz III hasítja ki a 110 kDa méretű T-7 RNS-polimerázt, amely képes a fágkromozómán levő további 25 gén átírására.



INOVIRIDAE ινωδες rostos



Az *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* és a *Vibrio* nemzetségben előforduló egyszálú DNS-fágok 760-1900 nm méretű, 12 % nukleinsavat és 88 % fehérjét tartalmazó, helikális szerkezetű csőszerű hajlékony fonalak. Az egyszálú, 5833-6883 bázist tartalmazó körkromoszómán átlapolva 9 gén található.

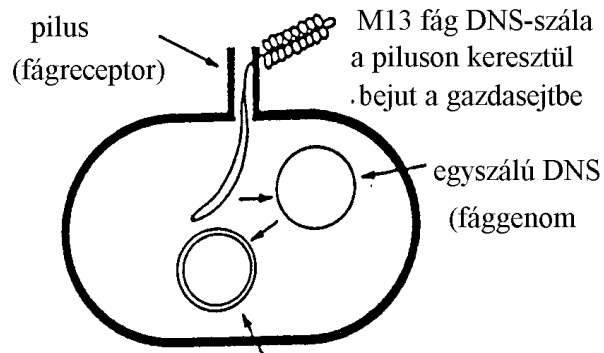
Morfológiailag eltérő alakok

A C-2 colifág korongszerű;

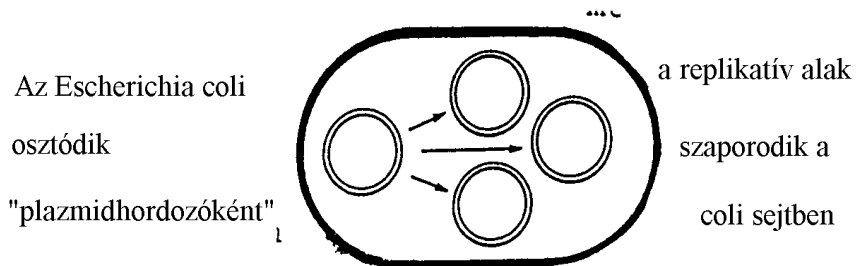
A colifág-X hajfűrt-szerű mozgékony fonál;

A *Pseudomonas* Pf1 fág pedig feltűnően merev.

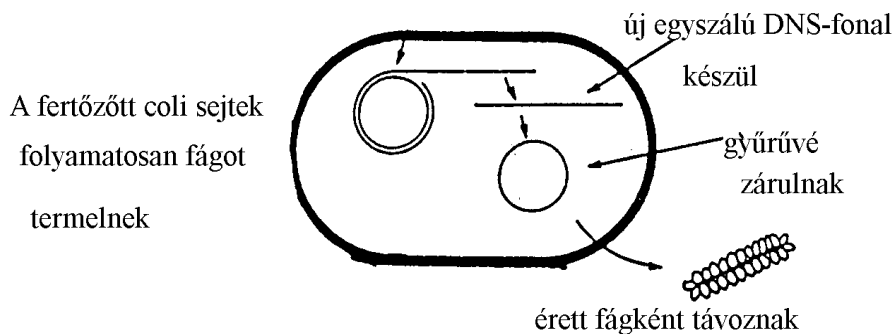
M13 fág szaporodási folyamata



Kétszálú replikatív alak készül a gazda replikációs mechanizmusa segítségével



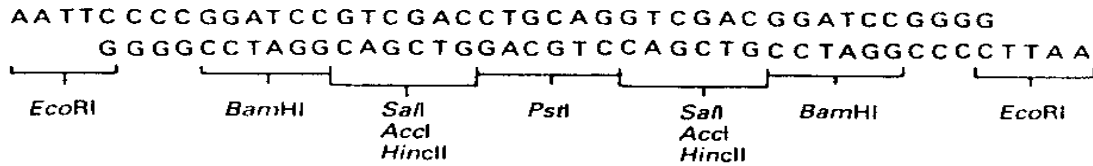
"rolling circle" mechanizmus működésével



A piacon beszerezhető, leginkább használt endonukleázok (restriktációs enzimek)

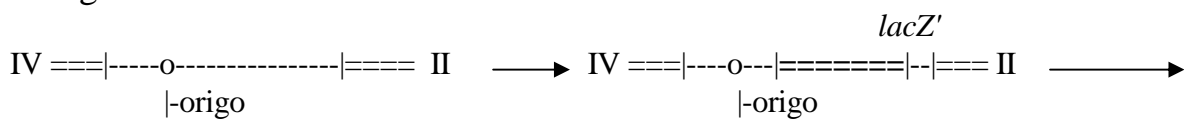
ENZIM	enzimforrás	A hasítás helye
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	$\begin{array}{c} \text{C-T-T-A-A}\downarrow\text{G-5}' \\ 5'\text{-G}\uparrow\text{A-A-T-T-C-} \end{array}$
<i>EcoRII</i>	<i>Escherichia coli</i>	$\begin{array}{c} \text{C-G-G-A-C}\downarrow\text{G-5}' \\ 5'\text{-G}\uparrow\text{C-C-T-G-G-C-} \end{array}$
<i>HindII</i>	<i>Hemophilus influenzae</i>	$\begin{array}{c} \text{C-A-Pu}\downarrow\text{Py-T-G-5}' \\ 5'\text{-G-A-Py}\downarrow\text{Pu-A-C-} \end{array}$
<i>HindIII</i>	<i>Hemophilus influenzae</i>	$\begin{array}{c} \text{T-T-C-G-A}\downarrow\text{A-5}' \\ 5'\text{-A}\uparrow\text{A-G-C-T-T-} \end{array}$
<i>HaeIII</i>	<i>Hemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} \text{C-C}\downarrow\text{G-G-5}' \\ 5'\text{-G-G}\downarrow\text{C-C-} \end{array}$
<i>HpaII</i>	<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	$\begin{array}{c} \text{G-G}\downarrow\text{C-5}' \\ 5'\text{-C}\uparrow\text{C-G-G-} \end{array}$
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	$\begin{array}{c} \text{G-A-C-G}\downarrow\text{T-C-5}' \\ 5'\text{-C}\uparrow\text{T-G-C-A-A-} \end{array}$
<i>SmeI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	$\begin{array}{c} \text{G-G-G}\downarrow\text{C-C-C-5}' \\ 5'\text{-C-C-C}\downarrow\text{G-G-G-} \end{array}$
<i>BamI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$\begin{array}{c} \text{C-C-T-A}\downarrow\text{G-G-5}' \\ 5'\text{-G}\uparrow\text{G-A-T-C-C-} \end{array}$
<i>BglIII</i>	<i>Bacillus globiggi</i>	$\begin{array}{c} \text{T-C-T-A}\downarrow\text{G-A-5}' \\ 5'\text{-A}\uparrow\text{G-A-T-C-T-} \end{array}$

A *lacZ* szakaszba kialakított EcoRI restriktációs enzim számára alkalmas szerkezet segítségével, az általa nyitható részbe tetszőleges DNS darab ültethető.



Polilinker a restriktációs nukleázok feltüntetésével

Intergenikus elem

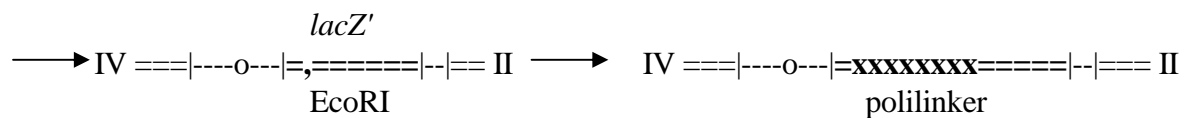


Az EcoRI számára kedvező szekvencia kialakítása *in vitro* mutációval oldható meg, mivel a *lacZ'* strukturgén egyik tripletjében egyetlen bázis cseréjével kialakul GAATTC szerkezet.

Az M13 fág DNS-be épített *lacZ'* fehérje szerkezete -met - thr - met - ile - thr - asp - ser...
DNS szekvencia -ATG-ACC-ATG- ATT-ACG-GAT-TCA..

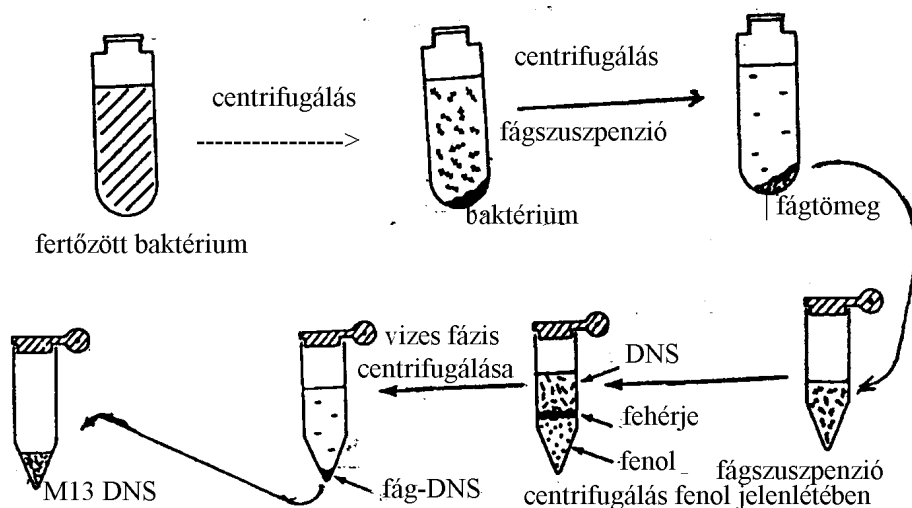
az egy-pont mutációval módosított szerkezet ... -met - thr - met - ile - thr - asn - ser -...
és a DNS szekvencia ...-ATG-ACC-ATG-ATT-ACG-AAT-TCA-...
|o-----EcoRI-----o|

A polilinker beépítése ezután már az EcoRI ligáz feladata. Ezzel a művelettel lehetővé válik a polilinkerben működtethető restriktációs endonukleázokkal kompatibilis DNS szakaszok beépítése. A fágban kódolt replikációs fehérje a kétszálú



genomról előállítja az egyszálú fág "kromoszómát" amit magába burkol a gazdaszervezetben elkészült fágfehérje

Optimális körülmények között 10^{12} fágreszecske/ml koncentrációt lehet elérni a tenyészközegben, amelyből az egyszálú DNS-t tartalmazó fág könnyen izolálható. A fág kicsapására polietilén-glikol használható. A fehérjeteket fenolos extrakcióval lehet eltávolítani.



M13 fág-DNS előállítása a fertőzött baktériumból

Jellegzetes Inoviridae csoportként tartjuk számon a szigorúan *Mycoplasma* fajokat fertőző vírusokat. Az *Acheloplasma laidlawii* vírusa egy 85 x 14 nm méretű pálcika, amelynek a két végén egy-egy ikozahedrális részecske zárja le a csőszerű képletet.

MICROVIRIDAE μικροϋ kicsi

Az *Escherichia coli*, *Salmonella* és *Shigella* fajokból izolálható, egyszálú DNS-fágok heterogén csoportjának 30 fajtát izolálták.

A virion moltömege 6,7 Mda. fehérjetartalma 74 %, egyszálú, cirkuláris DNS-tartalma 26 %, moltömege 1,7 MDa.

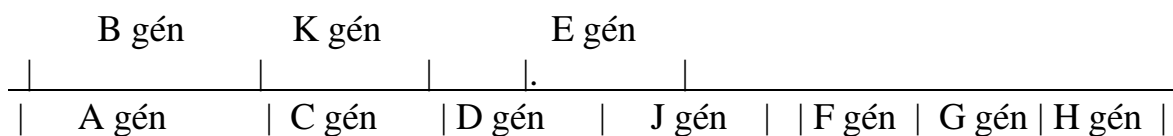
Nem károsítja a kloroform, cézium klorid, karbamid, a DNáz és az RNáz.

Jól bírják az ultrahangkezelést és érzéketlenek az UV fényre, de hőérzékenyek..

Legismertebb képviselőjük az ikozahedrális morfológiájú ϕ X174, Szerológiailag közel állnak a G6, G13, 101, 103, 107, 109, S13, oA, oR fágok. A ϕ X174 faj és a d03, d04, d05, G4, G14, ST-1, ZD/13, a3 között nincs kapcsolat Tizenegy egyszálú DNS-fág esetében ezt a kérdést részletesen nem vizsgálták.

DNS-hibridizációs módszerrel a ϕ X174 és az S13 fágot összehasonlítva a kromoszóma egyetlen darabkája (4,7 %) mondható teljesen homológoknak és csupán 36 %-a között lehet kimutatni némi hasonlóságot E csoport örökítő anyaga egyetlen DNS-szál. A G4-fág 5577 bázist, a ϕ X174 pedig 5386 nukleotidot tartalmaz. A bázismennyiségnek az információtartalmát növeli, hogy az egyes gének átfedik egymást. Az A génben található a B gén, az E gén pedig a D génben helyezkedik el, a K gén viszont átfedi az A és C géneket. A kilenc gén közül kettő kódolja a szimpla szálú DNS szintézis enzimeit. Az átfedő gének startpontjaival különböző fehérjék képződése indul. Négy gén a tokot alkotó fehérje mRNS képződését teszi lehetővé. 192 fehérjemolekulából épül fel az ikozahedrális tok. A 12 csúcsú, 20 lappal határolt (ikozahedrális) tok felépüléséhez 60 tokfehérje, 60 G-típusú és 60 F-típusú, 12 H-típusú csúcsfehérje szükséges.

Átfedő gének a ϕ X174 fág DNS szálon (5386 bázis)

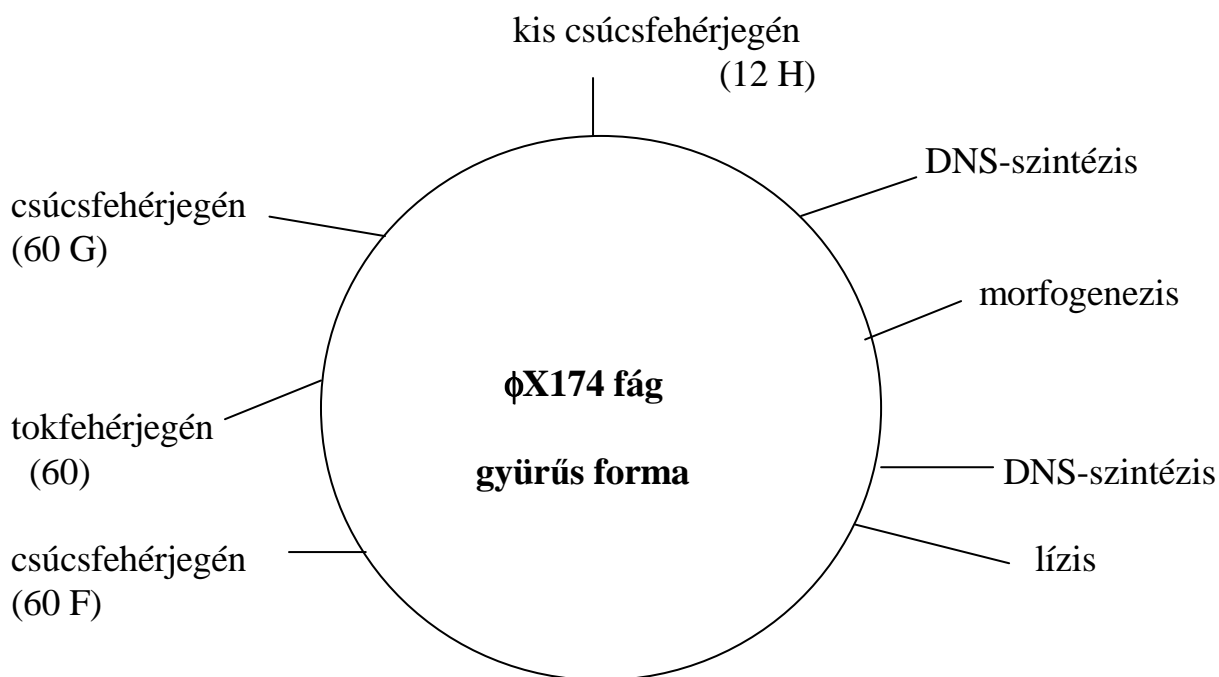


A szimpla szálú fertőző fág-DNS-ről, a "+" szárról a gazdasejt enzimmérendőszete készít "-" fonalat.

Az elkészült dupla szárról hagyományos módon készülnek a felsorolt fehérjékhez szükséges mRNS-molekulák.

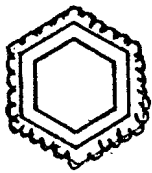
A negatív szárról a fág-DNS-ben kódolt enzimek segítségével nagy mennyiségben készül a fertőző "+" szál, amely azután tokba zárva a gazdasejt lízisekor a környezetbe kerül, ahol az érett fág újabb érintetlen sejtet támad

Egy gén a gazdasejt lízisét elősegítő enzim információját hordozza, ez utóbbi gén megfelelő szabályozó mechanizmussal, hibridplazmidba építve, a gazdasejt feltáráására használható.



TECTIVIRIDAE τεκταινομοι építő. Kettős burokkal ellátott kisméretű 15 % nukleinsavat, 65 % fehérjét és 20 % lipidet tartalmazó, ikozahedrális fej fogadja be a 9,9 MDa tömegű, 25 gént kódoló kettős szálú DNS fágkromoszómát. A fertőző fág elektronmikroszkópos felvételein nem látható farok, mégis a fertőzési aktus közben készült fényképeken jól látható a csőszerű képlet, amely segíti a fág-DNS bejutását a megtámadott sejtbe. A külső lipidburok oldószeres lemosása után a belső fehérjeburokból előtűnő farok szerű képlet gyakran láthatóvá válik

CORTICOVIRIDAE cortex kéreg.



Lipid tartalmú köpeny borítja a fehérjetokot, amelyben a kettős szálú DNS fágkromoszóma található. A fág foszfolipid-tartalma kémiaiag eltér a gazdaszervezet foszfolipid építőelemeitől. A fág külső lipiddköpenyének zsírsav építőelemei azonban megegyeznek a gazdaszervezet zsírsavösszetételével. A fertőzés után, egy-két órás látens periódust követően indul a fágkromoszóma kettőződése, mégpedig az óramutató járásával ellenkező irányban. A szaporodási ciklusban általában 100-400 virulens fág képződik egy-egy gazdasejtben.

PLASMAVIRIDAE πλασμα viaszból készült

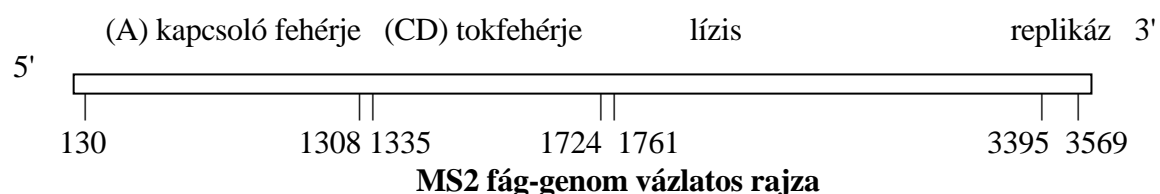
Az egyszálú DNS-kromoszómát egy lipiddtartalmú külső burokbán levő 10-12 fehérjéből kialakított belső test tartalmazza. Az idesorolt néhány pleomorf, 70-90 nm átmérőjű, gömbalakú fajt (MVL2, MVL72) az *Acheloplasma* különböző törzseiben találták.

LEVIVIRIDAE levis (latin) csekély

RNS-fágok (R-17, F-2, MS-2, Q) kis méretükkel tűnnek ki, átmérőjük 20-25 nm. A szaporodási ciklusuk alatt 5-10 ezer utódrészecskét hoznak létre.

Kis méretű 3500 nukleotidból álló (egyszálú RNS) kromoszómájuk 3 gént kódol. A 30,9 % nukleinsavat és 69,8 % fehérjét tartalmazó MS-2 RNS-fág 180 fehérjemolekula asszociátuma. — Az ikozahedrális fejben elhelyezkedő, 3569 bázist tartalmazó lineáris kromoszómán található három gén közül a (CD), a 129 aminosavból álló, 14,7 kDa méretű tokfehérjét (capsid) kódolja. — A másik gén (A), a gazdaszervezethez való kapcsolódást (attachment) biztosítja, (350 aminosav) A harmadik gén által kódolt fehérje a vírus önreplikációjához szükséges.

A fertőzést okozó "+" RNS-szál a transzlációs lépésben használható mint mRNS. A "+" szál a baktériumba jutva a közepén elhelyezkedő tokgén előtt lévő riboszóma-kötőhely segítségével a gazdaszervezet riboszómájához kapcsolódva indítja a fágfehérje szintézist.

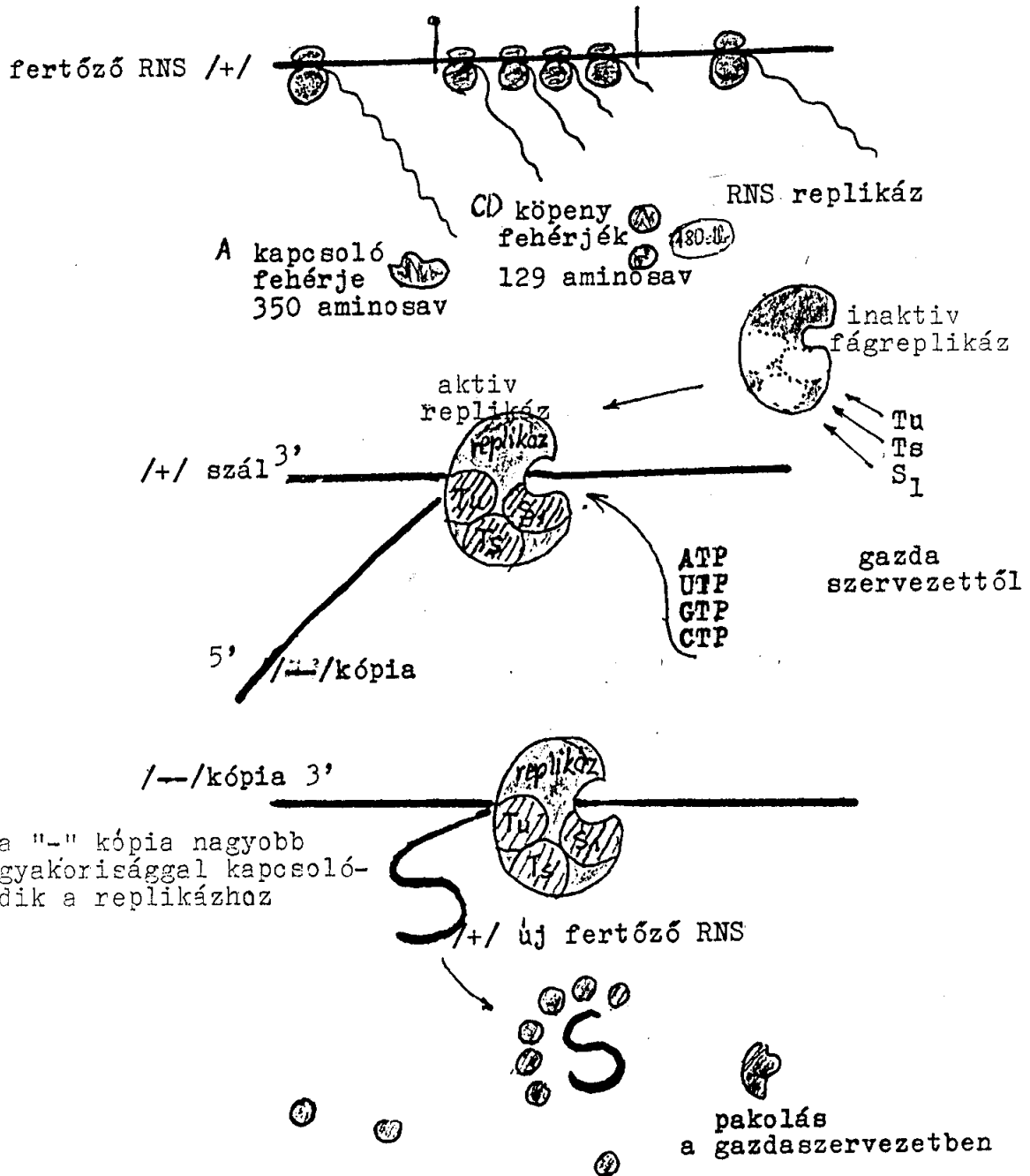
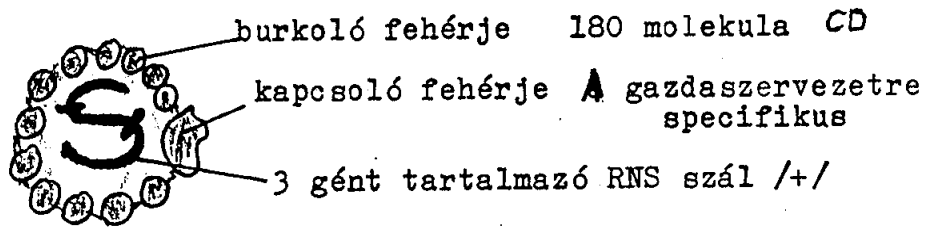


A vírusgén önreplikációját megelőzi a replikáz fehérje szintézise, ami a gazda fehérjeszintézis faktoraival (Tu, Ts, S-1) együtt alkotja az aktiv RNS-replikázt.

Ez a négy fehérjéből álló komplex a fertőző szál 3' végéhez kötődve a gazdaszervezet ribonukleozid-trifoszfát készletének a terhére megkezdődik a "–" komplementer szál készítését 5'-3' irányban. —

MS-2 RNS-fág szaporodási folyamata

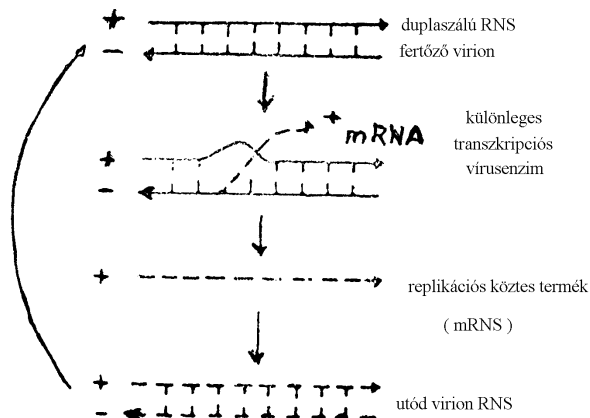
érett
fertőző
RNS-fág



A képződő "-" szál nem kapcsolódik a mintaként szolgáló, valójában komplementer "+" RNS molekulához, hanem felveszi a saját bázissorrendjéből adódó speciális szerkezetét. Mivel a vírusreplikáz affinitása nagyobb a "-" szál 3' végéhez, ezért lényegesen több "+", fertőző szál képződik a szaporodási ciklus végére. A folyamatot segíti, hogy a fertőző szál körül a köpenyfehérjék

aggregálódnak. A relatív feldúsuló negatív szálak a gazdaszervezet energia- és építőelem-készletétől függő mértékben egyre újabb "+" szálak képződését segítik elő. A fág fertőzés befejező lépése a gazdasejt pusztulása.

CYSTOVIRIDAE κύστος görbe, hajlott



A cystoviridae szaporodása

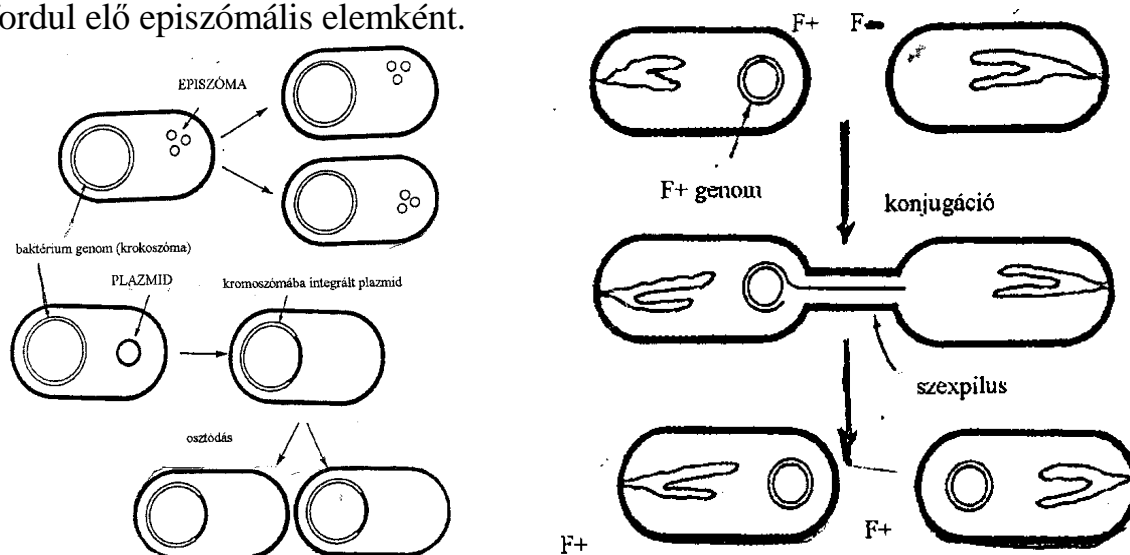
Ez a különleges transzkriptációs enzim a +mRNS képződését és erről a – szál képződését katalizálja, amely szál a fehérje építőelemek szintéziséhez szükséges információt tartalmazza. A külső köpeny lipidoldószerekkel, detergenssel támadva lemozdítható. Ilyenkor egy 55 nm átmérőjű hexagonális tok (dodekahedron) válik láthatóvá, amely 28 % RNS-t és 72 % fehérjét tartalmaz.

A *Pseudomonas phaseolicola* tenyészetéből izolálták a 10,4 megaDa tömegű, kétszálú RNS-genomot tartalmazó, lipoproteinből felépülő 75 nm átmérőjű tokba zárt részecskét.

A $\phi 6$ -fág 11,5 % nukleinsavat, 66 % fehérjét és 22,5 % lipidet tartalmaz. Jellegzetessége a különleges RNS-transzkriptáz, amely a fágkromozómát körülvevő fehérje nélkülözhetetlen alkatrésze.

EPISZÓMÁK - PLAZMIDOK

A prokariota és az alacsonyabb rendű eukariota sejtben előforduló, a kromoszómától független, önálló replikációra képes genetikai elemeket plazmidoknak nevezzük. Általában a baktériumokban a DNS-tartalom 0,5-2%-a fordul elő episzómális elemként.



Az első plazmid, amit azonosítottak az *Escherichia coli* 100 kb méretű szexfaktora, másnéven F faktor (fertility factor), amely a mikroba konjugáló képességét hordozza. A Lederberg és Tatum által felfedezett, a baktériumsejt konjugációját létrehozó F-faktor kb. 60 fehérje molekulát kódol.

F-plazmidhoz kötött a szexpilus képződése és rendeltetésszerű működtetése. A szexpilus képződése csak bevezeti a folyamatot, később ez a két konjugáló sejt membránja közötti kapcsolattá fejlődik. Az információt hordozó DNS átadása a kialakult plazmahídon keresztül történik. Az információ átadása mindkét partnerben a DNS-polimeráz aktív működését igényli. A szexfaktor irányításával kerül át az egyik szál a recipiens sejtbe, ahol a komplementer szál elkészül. A donor sejtben vissza maradó szál komplementer szála az információ átvitelével egyidejűleg készül.

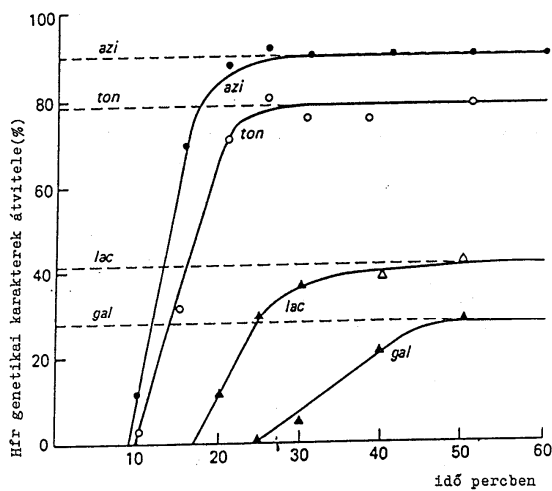
A plazmid géntérképe kb 100 gén jelenlétére utal. A plazmid tekintélyes részén találjuk a szexdukciót irányító szakaszt, összefoglaló néven *tragéneket* (transzfer), amelyek 3 operonba szerveződve teljesítik feladatukat. A *traA* gén terméke a 13000 (M)tömegű primer fehérje, amelyről a *traQ* gén kódolta proteáz emészt le az 51 aminosavból álló szignálfehérjét. A visszamaradó, terminális amino csoportján acilezett globuláris fehérje — a 7 kDa tömegű pilin — egymáshoz kapcsolódva alkotja azt a spirálisan elhelyezkedő fehérje fonalat, amelyből a donor baktérium egy két szexpilusa szerveződik. A *traA* és *traG* közötti gének felelősek a kapcsolat stabilitásáért a szexuális folyamat alatt. A DNS átvitelben a *tragéneket* elején *traM* és *traJ* valamint a végén működő *traD*, *traI* és *traZ*

gének terméke jeleskedik. Az ezután elhelyezkedő (IS) inszerciós (integrációs) szekvenciák a kromoszómába ékelődés helyét határozzák meg.

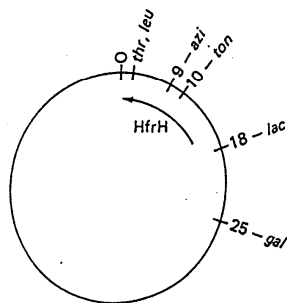
oriT || M | J | Y | A | L | F | K | B | P || V | W/C || U | N || F || Q || H | G | | S | | T || D || I Z | IS |
 67 _____ 100

Az ábra a *tragének* elhelyezkedését mutatja a F-plazmid 67—100 koordináták között.

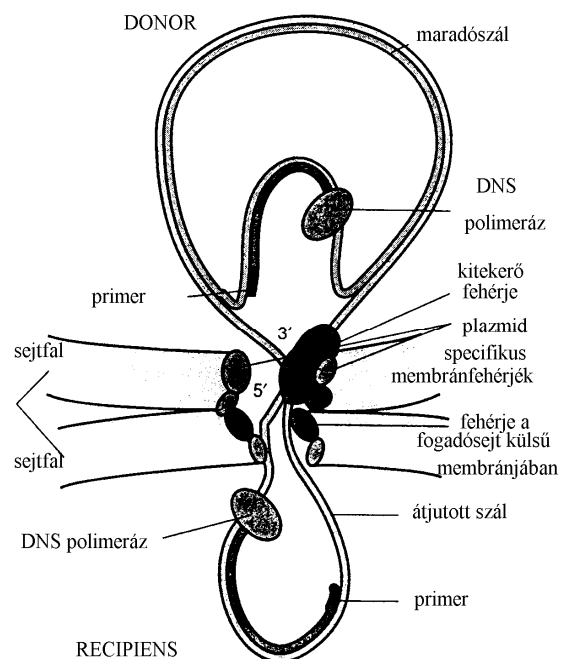
Az ábra a donor és recipiens konjugációs folyamatát mutatja az F faktor átvitele közben. Ez a faktor adott esetben képes egy vagy több tulajdonságot átjuttatni a donor sejtől a recipiensbe, mégpedig oly módon, hogy az F-faktor a gazdaszervezet kromoszómájába épülve, kilépéskor a donor kromoszómáját, vagy csak egy szakaszát is magával viszi.



Hfr-törzs konjugációja F⁻-recipiens törzsszel



Hfr törzs: Thr⁺ Leu⁺ Azi^S T1-fág^S Lac⁺ Gal⁺ Str^S
 F⁻ törzs: Thr⁻ Leu⁻ Azi^R T1-fág^R Lac⁻ Gal⁻ Str^R



Az Hfr- (high frequency of recombination) sejtek nagy gyakorisággal konjugálnak F⁻ sejtekkel. Mechanikai hatás a konjugációs folyamatot megszakíthatja, és így a módszer a kromoszómán elhelyezkedő gének sorrendjének a meghatározására használható.

A plazmid kromoszómába épülését az úgynevezett IS elemek (integrációs szekvencia) jelenléte segíti elő. Az F-faktoron levő két IS-elem az *E. coli* kromoszómán található 22 IS-elem valamelyikével léphet kapcsolatba. A belépés és a kilépés helye természetesen változhat, amiből következik, hogy a távozó plazmid különböző kromoszóma szakaszokat vihet magával. Az IS-elemek mentén a plazmid mérete bármikor bővíthet újabb rezisztencia determinánsokkal, de ugyanezen az úton el is veszíthet tulajdonságokat.

Az antibiotikumokkal szemben kialakult rezisztencia gyors elterjedését okozó R-faktort, a vérhasjárványt okozó *Shigella* törzsekben 1950-ben fedezték fel, de csak 1963-ban sorolták a plazmidok közé Watanabe tanácsára. Ez az egészségügyi szempontból fontos felismerés felgyorsította a kutatómunkát ezen a területen. Hamarosan kiderült, hogy ezek a plazmidok olyan enzimek génjeit hordozzák, amelyek az antibiotikumokat inaktiválják.

A hetvenes évektől a plazmidok tudományos jelentősége fokozódott. Az elméleti vizsgálatok gyakorlati eredményeinek a hasznosítása századunk utolsó negyedében a biológia forradalmi fejlődését indította el. A géntechnológusok ezeket a rezisztenciát hordozó plazmidokat, illetve ezek elemeit használják ma az új tulajdonságokat hordozó vektorok, hibridplazmidok, mesterséges gének előállítására.

Két típusuk ismert. Az egyik csoport, az episzómák mindvégig megőrzik önálló, kromoszómától független létüket. A másik csoportba sorolt plazmidok viszont "ragadós" véggel rendelkezvén képesek beépülni, integrálódni a gazdasejt kromoszómájába, majd adott körülmények között a kromoszómából kilépve és gyűrűvé záródva független fejlődési ciklust indítanak el. Tehetik ezt azért, mert működőképes bennük a replikációs origó és megtalálható bennük a termináló szakasz. Élettani viselkedésük bizonyos tekintetben a temperált fágokéhoz hasonló. A plazmidok többnyire valamilyen előnyös tulajdonságot kölcsönöznek a gazdaszervezetnek. Bizonyos környezeti körülmények között a jelenlétük a szelekciós nyomással szemben határozott előnyt jelent. Elvesztésük természetes körülmények között nem károsítja a gazdaszervezetet, sőt a szelekciós nyomás hiányában a plazmidvesztés kópiaszámától függően előbb-utóbb bekövetkezik.

Plazmidhordozók illetve plazmidszülők a cianobaktériumoktól a mikoplazmákig a különböző rendszertani csoportokban gyakran előfordulnak. Ezek a plazmidok vagy az ellenállóképességet növelik (antibiotikum rezisztencia, nehézfém-tűrés, fágerezisztencia, hőtűrés, UV-érzékenység csökkenése, stb.) vagy a környezettől függően adott esetben metabolikus előnyt jelentenek (β -galaktozidáz, N-kötés, citráthasznosítás, stb.) más esetben patogén tulajdonságokat hordozhatnak (*Bacillus anthracis* toxin, *Clostridium tetani* toxin, *Escherichia coli* toxin, *Bacillus anthracis* tokképzése, stb.).

A bakteriális eredetű plazmidok általában kettősszálú, helikális szerkezetű, kovalens kötéssel gyűrűvé zárt DNS-molekulák. Méretük változatos; 1-400 kb. Az egy sejtben előforduló plazmidszám (kopiaszám) is változhat. A nagy plazmidok 1-2 példányban fordulnak elő, a kis méretűek száma viszont meghaladhatja a százat is. Kinashi számolt be először fonalas plazmidok létezéséről (Nature 328:454-456. 1987).

Kezdetben a plazmidokat felfedezőik a funkcióra utalva nevezték el. Így született az F-plazmid (fertilitási faktor) vagy az antibiotikum rezisztenciát okozó R-plazmid és a baktericid hatású colicin képződését segítő Col-plazmid. Ez utób-

biak között találjuk a géntechnológusok kedvencét, a kicsiny, 5 MDa méretű Col-E1 plazmidot, ami génklónozáshoz különösen előnyös, mivel az EcoRI-endonukleáz csupán egyetlen helyen hasítja.

A hetvenes évek közepétől Novick javaslatára az újonnan felfedezett plazmidokat egységesen jelölik. A kis p betű után a felfedezőre, vagy a kutatóhelyére utaló 2-3 nagybetűt, majd ezt követően a plazmid nyilvántartási számát találjuk. Tehát a pUB110 a Bristol Egyetemen felfedezett 110-ik plazmidot jelöli. Az USA-ban létesített Plasmid Reference Center 1976 óta éberrel vigyáz az elnevezések megbízhatóságára. Ezek az azonosított plazmidok az ATCC gyűjteménybe kerülve, a kutatók számára hozzáférhetők.

A plazmidok tehát megkettőződésre képes replikonok. Az extrakromoszómális elem egy-egy új kópiája a kezdő és a termináló szakasz birtokában a gazdaszervezetben működő DNS-polimeráz III segítségével képződik.

A plazmidok vektorként egy-egy gén klónozására használhatók. A pBR322 plazmid tetraciklinrezisztenciát hordozó génjét ezért olyan restriktív enzimmel hasítják, amely lehetőleg csak egy ragadós véget hagy maga után. Az idegen DNS darabot ugyanezzel az enzimmel hasítva a nyert fragmentumok összekapcsolódnak a linearizált plazmid DNS-be. A kapcsolatot ligáz erősíti meg a gyűrűs szerkezet kialakításával. Ez a vektorként használható plazmid *E.coli*-ba transzformálható, ahol mivel az ARS régiót a beavatkozás nem érintette elszaporodik. Az a baktérium, amelyben az idegen DNS-t tartalmazó plazmid jelen van, könnyen kiválasztható a tetraciklinrezisztencia elvesztése miatt.

A replikáció módjában is nagy a változatosság. Az F-plazmid két irányban replikálódik, az R-1 és a Col-E1 esetében viszont csak egy irányban halad a replikációs villa. A plazmid általában a sejtosztódással szinkronban kettőződik, mert az indításhoz többnyire egy kromoszómán kódolt indító fehérje szükséges.

Az iniciáló fehérjék nagy specifikitása miatt a plazmidok többnyire csak a gazdaszervezetükben replikálódnak, illetve azokban a szervezetekben, amelyek hasonló szerkezetű indító fehérjét használnak. Ezért a géntechnológusok olyan hibrid plazmidokat állítottak elő, amelyek két különböző fajra specifikus kezdőponttal rendelkezve, meglehetősen távoli fajokban, például *Staphylococcus*-ban és élesztőben is lehetővé teszik a plazmid replikációját (Nature 298:488-492, 1984).

A nagy kópiaszámú előforduló plazmidok replikációjához viszont nem kell indító fehérje, mert tartalmaznak egy olyan DNS-szakaszt, amely a replikációt indító fehérje nélkül is fogatosítja. Ilyen esetben tovább növelhető a kópiaszám kloramfenikol adagolásával. Ez az antibiotikum gátolja a kromoszóma kettőző-dését irányító fehérje képződését, miközben a plazmid replikációja zavartalanul folyik.

Az elmúlt évtizedben a géntechnológusok tevékenysége nyomán nagy számban készültek mesterséges plazmidok. Ezek annyiban hasonlítanak a természetesre, hogy mindegyik tartalmazza az úgynevezett ARS régiót (autonomously

replicating sequence), amely a kromoszómától független megkettőződés képességét jelenti. Így előállítottak élesztőben fenntartható emberi, egér, kétéltű, növény, rovar és prokarióta géneket tartalmazó hibrid plazmidokat, sőt olyan bifunkcionális plazmidokat, amelyek nem csak az élesztőben, de a prokariótában (*Escherichia coli*) is fenntarthatók.

Mint látható nincs semmi genetikai biztosíték arra, hogy az osztódó sejtek mindegyike azonos mennyiségű plazmidot fog hordozni. Egy idő után az osztódó sejtek között plazmid nélküli egyedek jelennek meg. Sőt, mivel a plazmid képződése energia- és anyagigényes folyamat, a plazmid jelenlétét igénylő szelekciós hatás megszűntével a plazmid nélküli egyedek elszaporodhatnak. Ilyen szelekciós nyomás lehet a rezisztenciát hordozó plazmid esetében az illető antibiotikum jelenléte, vagy a β -galaktozidáz gént hordozó plazmid esetében az egyedüli szénforrásként laktózt tartalmazó táptalaj. A plazmidvesztés szempontjából tehát stabil és nem stabil plazmidokról beszélhetünk.

Az egyes plazmidok fertőzőképessége jelentős mértékben eltérhet. A plazmidok elterjedésének kedvez a szelekciós nyomás. Az úgynevezett transzferábilis elemeket hordozó plazmidok könnyen fertőzik a plazmidmentes mikroba törzseket. A transzferábilis elemeket hordozó plazmidok egy része - mégpedig azok, amelyek transzponáló elemeket is hordoznak - fontos szerepet tölthet be az evolúció folyamatában. A transzponáló elemek a gazdaszervezet kromoszómájából származó DNS-darabokat képesek más mikroorganizmusokba juttatni.

EXTRAKROMOSZOMÁLIS ELEMEEK AZ EUKARIOTÁKBAN

A sejtmagban és a mitokondriumban található kromoszómákon kívül különböző méretű DNS-szakaszok jelenlétét igazolták az élesztőkben, fonalas gombákban és a nyálkagombákban. Bizonyos esetekben az extrakromoszomális DNS-elemek nagy csoportját alkotják a nagy mennyiségben képződő fehérjék nagy kópiaszámú előforduló génjei, valamint a riboszomális RNS ugyancsak nagy kópiaszámú előforduló negatívja. Az eukariota genom bonyolultságára és nagyfokú plaszticitására utal az extrakromoszomális elemek minőségi variációja. A szakirodalom a tárgyalhatóság megkönnyítése érdekében négy csoportba sorolja a sejtmagban található, részben már említett kromoszómán kívül fellelhető DNS állományt.

- 1) A sejtszervecskékben levő DNS
- 2) Plazmidok formájában levő DNS
- 3) A szaporodó gének DNS-tartalma
- 4) A DNS-átrendeződés köztes termékei

Ezt a csoportosítást nem tekinthetjük határozott elkülönítésnek, mert a besorolás nem kevés bizonytalansággal végezhető csak el.

A sejtszervecskékben (mitokondrium, kloroplaszt, kinetoplaszt) előforduló DNS például a valamikor bekebelezett ősprokariota kromoszómájából származva az endoszimbiózisban élő prokariota genetikai állományának tekinthető. Elvileg tehát nem nevezhető extrakromoszomális DNS-nek.

Bonyolítja a besorolást az a tény, hogy ezekben a sejtszervecskékben, így a *Neurospora* mitokondriumában is található önállóan replikálódó, plazmidként elkülönülő DNS. (Nucleic. Acid. Res. 10:1439-58, 1982). Esser a *Podospora anserina* öregedő hifonalaiban a mitokondriumok kromoszómájából kiszakadó plazmidokat talált (Molec. Gen. Genet. 178:213-216, 1980). Ugyanígy kérdéses a *Trypanosoma* kinetoplasztjaiban található DNS-állomány besorolása. Ebben a szervecskében több ezer, 2,5 kb méretű kis plazmid és mintegy 50 nagyobb, 37 kb méretű, gyűrűs szerkezetű DNS található (Plasmid 6 7:210-220, 1982).

A legismertebb élesztőplazmid, az élesztő parazitájának tekinthető 2 μ m átmérőjű, 6318 bázispárt tartalmazó nukleáris plazmid. Ez a parazita a *Saccharomyces cerevisiae* sejtjeiben 60-80 példányban fordul elő. Annak ellenére, hogy a plazmid részletes térképét ismerteti a szakirodalom, mégis élettani feladata kevésbé ismert.

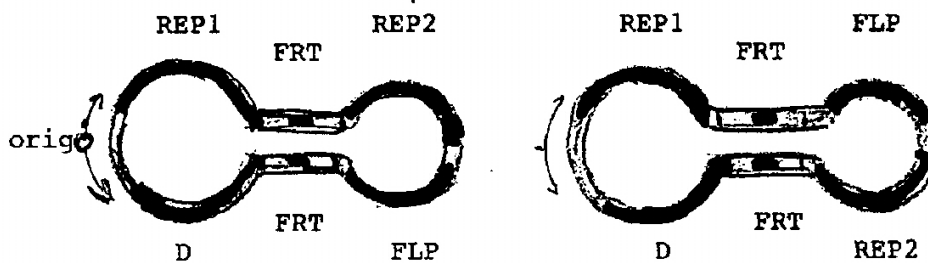
Minden plazmid a kromoszómákkal egy időben csak egyszer kettőződik a sejtciklus S-fázisában. A haploid sejtek sarjadzásakor a plazmidvesztés mérhető (10 ezrelék) gyakorisággal következik be. A diploid sejtek sarjadzásakor a plazmidvesztés valószínűsége több nagyságrenddel kisebb; gyakorlatilag nem mutatható ki.

Az élesztők szexuális ciklusában képződő α -faktor (S anyag) egyformán leállítja a kromoszóma replikációját és a 2 μ -os plazmid replikációját.

Négy különböző gént: az FLP-, REP1-, REP2- és a D-géneket hordozza. Ez utóbbit egyesek REP3-nak nevezik. Bizonyos vizsgálatok valószínűsítik az FLP-gén szerepét a kópiaszám szabályozásában. A négy gén által kódolt fehérjét előállították, tömegét meghatározták.

FLP - gén által kódolt fehérje	48619 Da
REP1-gén által kódolt fehérje	43231 Da
REP2-gén által kódolt fehérje	33196 Da
D (REP3)-gén által kódolt fehérje	21289 Da

A 2774 bázispárt és a 2346 bázispárt tartalmazó, két-két gént hordozó szakaszt két FRT-nek nevezett, 599 bázispárból felépülő összekötőelem kapcsolja össze. Így alakul ki a 8 plazmidra jellemző gyűrűs szerkezet. Az összekötő elem azonossága miatt a plazmid két izomer formában A és B izomérként fordul elő.



A replikáció kezdőpontja - az origó - az STB régió közelében, a D-gén mellett található. Innen indul a replikációs villa két irányban.

Nagyjából hasonló méretű és felépítésű plazmidokat találtak más élesztőfélékben

Zygosaccharomyces bisporus (Nucleic Acid Res. 13:4267-4283. 1985)

Zygosaccharomyces rouxii (J. Bacteriol. 151:1380-1390. 1982)

Saccharomyces bailii (J. Gen. Microbiol. 130:2527-2534. 1984)

Kluyveromyces drosophilorum (Nucleic Acid Res. 14:4471, 1986)

Több száz példányban előforduló plazmidokat írtak le a valamikor nyálkagombának nevezett állati és növényi sajátságokat mutató szervezetek legrészletesebben vizsgált képviselőiben a *Dictyostelium* (lásd 4110. fejezet) fajokban (J. Mol. Biol. 185:447-450, 1985).

A plazmidok egy csoportját alkotják azok az extrakromoszomális elemek, amelyek bizonyos élettani funkciók közben szabadulnak ki, illetve töredeznek le a kromoszómáról. Ide sorolják a fonalas gombák öregedésekor (lásd 4070. fejezet) a mitokondriumokból kiszakadó és a citoplazmában megjelenő plazmidokat is.

Extrakromoszomális elemek géntechnológiai hasznosítása

A plazmidátvitel hagyományos módja a konjugáció. Ismeretesek olyan úgynevezett konjugáló plazmidok, amelyek mobilizációs géneket tartalmazva megindítják az átvitelt és mobilizálják a nem konjugáló plazmidokat is. Ez a mobilizáló hatás azonban fölöttébb specifikus, csak bizonyos plazmidok átvitelét

segíti. A párosodás membránszűrőn összehozott szülőpárok között, de agar felületén, vagy kis térfogatú álló kultúrában is bekövetkezhet.

A bakteriális tulajdonság, adott esetben a plazmidban kódolt információ átvitelét egy alkalmas transzdukáló fág vagy egy indukálható profág is elvégezheti. Az eljárást módszerre fejlesztve transzdukciónak nevezzük.

A donor fágtenyészet nyerésének legegyszerűbb módja a kiválasztott fág és a baktérium együtt tenyésztése az agar táptalajra vitt 1-2 mm vastag olyan hígagarrétegben, amely 10 millió baktériumot és 10-100 ezer fágot tartalmaz ml-ként. A kinövesztés után a felső réteget 5 ml folyékony táptalajba szuszpendálva a fágok kiszabadulását néhány csepp kloroformmal lehet siettetni. Ezt követően centrifugálással történik a sejttörmelék eltávolítása, majd a nyert fáguszuspenzió membránszűrőt használva csíramentesíthető. A fágokban a gazdaszervezet kromoszómadarabjai random módon megjelenhetnek. Fággal fertőzött baktériumtenyészetben megfelelő szelekciós módszerrel a donor sejtől származó tulajdonság kimutatható.

Temperált fág alkalmazása esetén a profág indukciója UV-fénnyel történhet. A folyékony táptalajon kinőtt profágot tartalmazó tenyészetet centrifugálással fiziológiás sóoldatba szuszpendálják (100 millió/ml). Petri-csészében 1 mm rétegvasagságban UV-fénnyel kezelik (10-100 joule mm dózissal) 10-15 % túlélő szám eléréséig. A besugárzott tenyészetet táplevesben szuszpendálva 1-2 óra alatt bekövetkezik a lízis. A fáguszuspenzió csíramentesítése ez esetben is membránszűréssel végezhető.

A profág indukciója mitomycin-C (0,5 µg/ml) adagolásával is kiváltható, ha azt a táplevesen növekedő tenyészethez adjuk a késői logaritmikus fázisban (100 millió élősejt/ml). Adagolás után a tenyészetet sötétben célszerű tartani a lízis bekövetkeztéig. A fáguszuspenzió ez esetben is membránszűrővel csíramentesíthető.

A fenti módszerek valamelyikével nyert csíramentes fáguszuspenziót - amely bizonyos statisztikus valószínűséggel gazdaszervezetből származó DNS-darabokat tartalmaz - a recipiens sejtek tömény szuszpenziójához (10^9 sejt/ml) adva a fágadszorpció fél óra alatt bekövetkezik.

A fágadszorpciót követően, virulens fággal való fertőzéssel eltávolíthatók a tenyészetből a lizogén fággal nem fertőződött baktérium sejtek. (Virulens fággal csak a fágmentes sejtek fertőzhetők!) Az életben levő sejteket ezután szelektív táptalajra szélesztve a kívánt tulajdonságú transzdukált sejtek (aminosavigény, vitaminigény, stb.) növekedésnek indulnak.

A plazmid-DNS közvetlen bevitelére szolgáló módszer a transzformáció. Az eljárás legkényesebb pontja a transzformáció szempontjából a kompetens állapotban levő recipiens tenyészet előállítás. Erre szinte minden faj, sőt törzs esetében különleges gonddal egyéni módszereket munkáltak ki. Végeredményben az életképes befogadó sejtben a protoplazmamembrán átjárhatóságát kell a plazmid-DNS számára megteremteni. Ezt különböző fizikai, illetve kémiai módszerekkel

végrehajtott sokkolással (elektroporézis, elektrofúzió), protoplaszt képzéssel, polietilénlikol alkalmazásával érik el.