

3.3 Gének átvitele vektorokkal

Amikor vektorokról hallunk, elsőként a matematikában és a fizikában használatos vektormennyiségek jutnak eszünkbe (helyvektor, erő, térerősség, stb).

De a vektor kifejezés használatos a biotechnológiában is. Olyan biológiai rendszert értünk alatta, amivel egy (néhány) kiválasztott gént be lehet vinni egy sejtbe/szervezetbe. A DNS spontán behatolásra ritkán építenek, rossz hatásfokú technika. Nem elég egy oldatban összehozni a sejteket és a nukleinsav darabokat, mert ezek alig kerülnek be a sejtbe, és ott is az a veszély fenyeget, hogy az idegen DNS-t a sejt lebontja, és semmiképpen sem írja át. Ehelyett a természetben működő élő rendszereket használjuk fel, olyanokat, melyek arra specializálódtak, hogy saját DNS-üket bevigyék bizonyos sejtekbe. Ezeket az élő rendszereket, amelyekkel megfelelő átalakítás után az általunk kiválasztott géneket lehet átvinni, nevezik a biotechnológiában vektoroknak.

Még egy célszerű követelmény van a vektorokkal szemben: olyan formában kerüljön a sejtbe az új gén, hogy szaporodni is tudjon. Ideális természetesen az, ha be tud épülni a sejt kromoszómájába, és a sejtosztódással együtt szaporodik. Ez nem mindig érhető el, de megfelelő szaporodást jelent a plazmidok, vírusok sokszorozódása is.

Mit használhatunk vektorként?

1. **Plazmidokat.** A plazmidok nagyon egyszerű élőlények, még vírusoknál is egyszerűbbek, mert tokjuk sincsen, csak DNS-ük. Kis gyűrűs DNS darabok, melyek a kromoszómától függetlenül „élnek” a sejtekben. Önállóan duplikálódnak. Anyagcseréjük nincs, semmi mást nem tudnak csak duplikálódni. (bevihető: 1-10 kb)
2. **Bakteriofágokat.** Ezek is tulajdonképpen vírusok, de a baktériumok vírusai, és sokkal egyszerűbben működnek, mint pl. az emlős vírusok. (bevihető: 10-23 kb)
3. **Más vírusokat.** Ez alatt azt értjük, hogy minden élőlénynek, az élesztőknek, a növényeknek, az emlősöknek mind megvannak a maguk vírusai, amelyek a megtámadott sejtek tulajdonságaihoz alkalmazkodtak.
4. **Mesterséges kromoszómát.** Alkalmazhatunk mesterségesen létrehozott baktérium kromoszómát is (~300 kb).

Mit jelent a „kb” rövidítés?

A kb itt kilobázis-t jelent, 1000 bázispárt, ezzel a DNS méretét jellemezzük. Sokkal informatívabb, mint a vegyészek által használt molekulatömeg, vagy az ülepedési szám. Figyelembe véve, hogy egy bázis triplett kódol egy aminosavat, kiszámíthatjuk, hogy 1 kb 330 aminosavnyi információt jelent, azaz körülbelül egy nagyobb, vagy két kisebb méretű fehérje molekula kódolására elég. A bevihető DNS mennyiség a plazmidoknál a legkisebb, a további

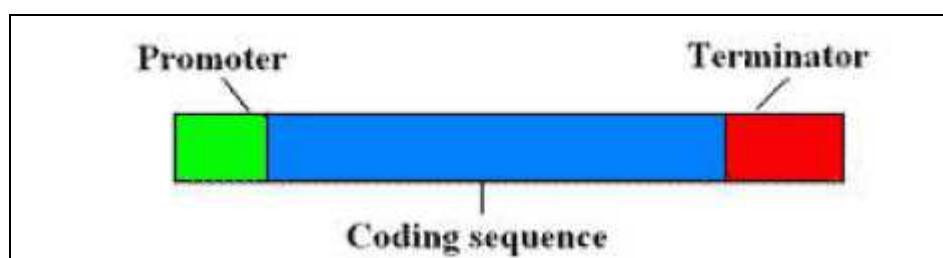
vektoroknál nagyobb. A vektor teljes DNS-e ennél lényegesen nagyobb, a bevihető mennyiség alatt azt értjük, hogy ennyi többlet még nem zavarja meg a vektor normális biológiai működését.

Ez a csoportosítás azon alapult, hogy milyen biológiai ágenst használunk a nukleinsavak átviteléhez. De más csoportosítás is lehetséges aszerint, hogy a vektor milyen mértékben segíti elő a bevitt gének működését.

E szerint elkülöníthetjük a klónozó vektorokat, illetve az expressziós vektorokat. A klónozó vektorok arra alkalmasak, hogy a gént bevigyék. Eljuttatják a sejt belsejébe, de a kiírást nem segítik elő. A klónozó vektor az csak a szállítási funkciókat végzi, a működtetést nem.

Az expressziós vektorok a klónozó vektoroknál sokkal komplexebbek. Az expresszió szó jelentése alatt itt a kifejezést, kifejeződést értjük. Tehát nem csak bekerül a gén, gének, hanem az expressziós vektor ezek kiírását, kifejeződését is elősegíti.

Ahhoz, hogy ezt a folyamatot megértsük, vissza kell gondolnunk az operon szabályozásra. Egy gén kiírásához kell lennie előtte egy promóter szakasznak, ahova a kiíró enzim odakötődhet - ez adja meg a kiírás kezdőpontját. A coding sequence, tehát kódoló bázissorrend, az tartalmazza annak a fehérjének a génjét, amit mi termeltetni szeretnénk. A terminátor szakasz a lezáró szakasz, ez jelzi a kiíró enzimnek, hogy itt a kiírás vége, a mRNS-t nem kell tovább folytatni. Ezt így együtt expressziós kazettának hívják. Más szakirodalmakban nevezik expressziós keretnek is, mert mintegy keretbe foglalja azt a gént, amit szeretnénk kiírni. A keret egyik oldala egy promóter, az indító szakasz, a másik oldala pedig a terminátor rész. Az 1. ábra ezt a szerkezetet szemlélteti.



1. ábra: Expressziós kazetta

A biológia ágens szerint csoportosított vektorok jellemzése:

Plazmidok Ezek a legegyszerűbbek. A plazmidok szaporodásához elengedhetetlen egy:

Replikációs origó: Az origó szó kezdőpontot jelent, a replikáció pedig lemásolást, sokszorosítást. Amikor a plazmidok kis gyűrűs DNS-e a sejtben duplikálódik, a másolás egy bizonyos pontban indul el, és ez a fix pont a replikációs origó. Ha nincs replikációs origó, vagy az adott sejtben nem működik, akkor ez a plazmid nem tud duplikálódni. A plazmidok a

sejt kromoszomális DNS-étől függetlenül másolódnak, sok kópia is létezhet egy sejtben. Amikor a sejt maga osztódásba kezd, a plazmidok a citoplazmával együtt kerülnek a két utódsejtbe. Több plazmid jelenléte esetén jó eséllyel mindkét utódsejtbe kerül legalább egy kópia.

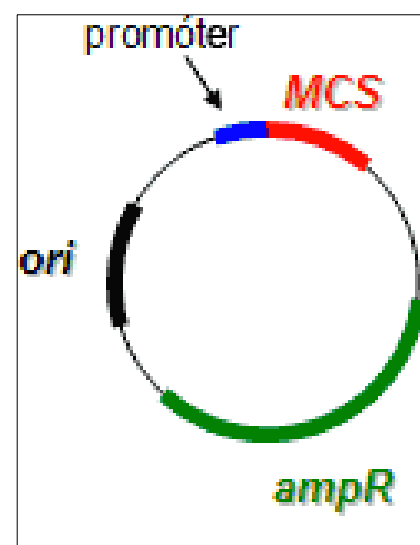
További alkotórészek a biotechnológusok által beépített expressziós kazetta részei (promóter szakasz, célgén(ek), terminátor szakasz).

A sikeres génátvitel kimutatására gyakran használnak beépített markergéneket. A marker szó jelentése jelző, jelölő. A marker gének megjelölik a sikeres plazmid bevitelen átesett sejteket. Hasznosak, mert a plazmid bevitel és az expresszió statisztikus folyamat, és számtalan sejt közül kell izolálni a megfelelő expressziós egyedeket. A több millió sejt között lesznek olyanok, amelyekben nincs plazmid, másokban ott van a plazmid, de nem működik, és lesznek - célunknak megfelelően - sikeresen expresszált egyedek is. Ez utóbbiak szelekciójára alkalmazzák a marker géneket, tehát olyan anyagcsere jelzőket, melyek a működő géneket tartalmazó sejtek szelekcióját segítik elő.

Mi lehet marker?

Pl. antibiotikum rezisztencia gén. Az antibiotikumok olyan gyógyszer hatóanyagok, melyek arra szolgálnak, hogy a mikroorganizmusokat elpusztítsák. A rezisztens mikroorganizmusok túlélnek az antibiotikus kezelést, mert rendelkeznek egy olyan génnel (= fehérjével), amely az antibiotikumot hatástalanítja. Ez lehet például egy enzim, amely az antibiotikum molekulát elbontja. Az antibiotikum rezisztenciát hordozó gén alkalmas markergénnek, ha a manipulálni kívánt sejt a plazmid nélkül érzékeny az adott antibiotikumra. A plazmidos kezelés után a sejteket a kérdéses antibiotikumot tartalmazó táptalajra viszik. A változatlan, vad típusú sejtek az antibiotikumtól elpusztulnak, és csak az tud növekedni, szaporodni, telepet képezni, amelyekben a plazmiddal bevitt rezisztencia gén bekerült és ki is fejeződik.

A 2. ábrán az **ori** (feketével) a replikációs origó. Az ampR = ampicillin rezisztencia gén. Az ampicillin a penicillin egyik típusa, amely sokféle mikroorganizmus elpusztítására képes. A rezisztencia gén egy olyan enzimet termel, ami az ampicilint hatástalanítja. Ha a sejtben ez a rezisztencia gén akár plazmid formájában is jelen van, akkor az ampicillin nem fogja ezt a sejtet elpusztítani. Az ábrán a kézzel jelölt rész a promóter szakasz. MCS = egy olyan szakasz, amiről eddig még esett szó. Ez a „multiple cutting site”, a „többszörösen felvágható hely”. Itt lehet felnyitni a gyűrűt és beilleszteni azokat a géneket, amelyeket szeretnénk a vektorral bevinni a sejtbe.

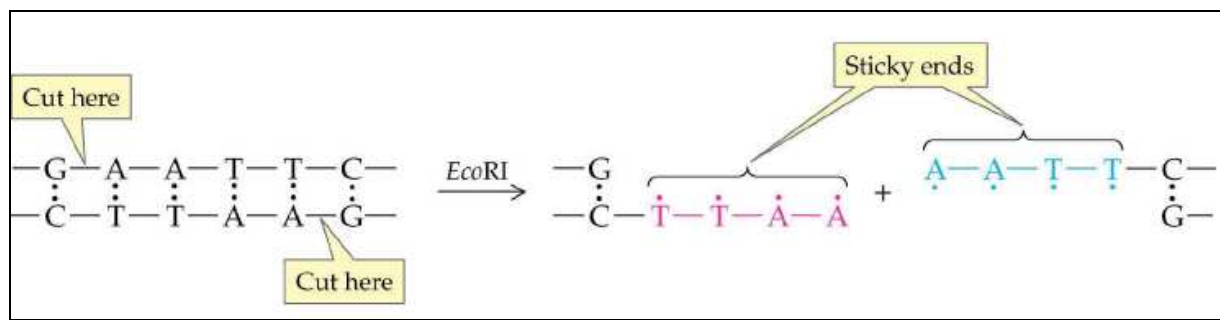


2. ábra: Plazmid vektorok

Az új gének beépítésével a plazmid mérete megnő. A plazmidoknál 1-10 kilobázis vihető be anélkül, hogy a plazmid normális működését megzavarnánk.

Hogyan lehet felválni a DNS-t?

A természetnek egy sajátos találmánya ez is. Vannak nagyon speciális enzimek, amelyek nagyon furcsa módon vágják el a DNS-t. A furcsaság abban rejlik, hogy nem keresztben hasítják el, hanem úgy, hogy rövid kis szimpla szálú szakaszok maradnak a DNS két végén. A másik különlegesség, hogy nem akárhol vágják el a DNS-t, hanem úgynevezett tükörképi szakaszoknál, ahol a két ellentétes lefutású DNS bázissorrendje egy rövid szakaszon fordított. Ezeket a szakaszokat nyitják fel úgy, hogy az végeken 4 vagy 6 bázis hosszúságú szimpla szálú szakasz marad szabadon. Ezek a szakaszok egymással komplementerek, egymással újra összekapcsolhatók.



3. ábra: „Ragadós végek”

Minden egyes enzim másfajta tükörképi szakaszt ismer fel és hasít.

Mit jelent a vágás?

A DNS állomány, a genetikai állomány manipulációjában ezek az enzimek, a restrikciós endonukleázok „játsszák az ollószerepét”, amivel adott helyen el lehet vágni a DNS-t. A 3. ábrán a cukor-foszfát láncokat a folytonos vonalak jelölik. Az enzim ezeket vágja el. A pontozott vonalak a gyenge hidrogénkötéseket jelzik, amelyek könnyen szétszakadnak, ekkor válik szét a két DNS vég. De ezek a komplementer szerkezet és a hidrogén kötések miatt hajlamosak arra is, hogy újra összetapadjanak. Az így kialakuló láncvégeket ragadós végeknek (sticky end) nevezik, mert egymás közelébe jutva hajlamosak összetapadni, és újra összekapcsolni a DNS végeit.

Mire használjuk ezt?

Ezzel vágjuk ki azt a gént, amit szeretnénk kivenni valamilyen élőlényből és betenni a plazmidba, valamint ezzel vágjuk fel a plazmidot is. Mindkét esetben egyforma restrikciós endonukleázokat használunk.

A restrikciós endonukleázokról többszámban volt szó, mivel sok van belőlük.

Mikroorganizmus	Enzim	szekvencia 5' → 3'	Bontási helyek száma			
			λ	Aα 2	SV40	φx174
<i>Arthobacter luteus</i>	AluI	AG↓CT	>50	>50	35	24
<i>Brevibact. albidum</i>	BalI	TGG↓CAA	15	17	0	0
<i>H. aegypticus</i>	HaeIII	GG↓C'C	>50	>50	19	11
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaI	GTT↓AAC	13	6	4	3
<i>Serr. marcescens Sb</i>	SmaI	CCC↓GGG	3	12	0	0
<i>B. amyloliquefaciens H</i>	BamHI	G↓GATC'C	5	3	1	0
<i>E. coli RY13</i>	EcoRI	G↓AA'TTC	5	5	1	0
<i>H. influenzae Rd</i>	HindIII	A↓AGCTT	6	11	6	0
<i>H. parainfluenzae</i>	HpaII	C↓C'GG	>50	>50	1	5
<i>K. pneumoniae OK8</i>	KpnI	GGTAC↓C	2	8	1	0
<i>X. holcicola</i>	XhoI	C↓TCGAG	1	6	0	1

4. ábra: Restrikciós enzimek

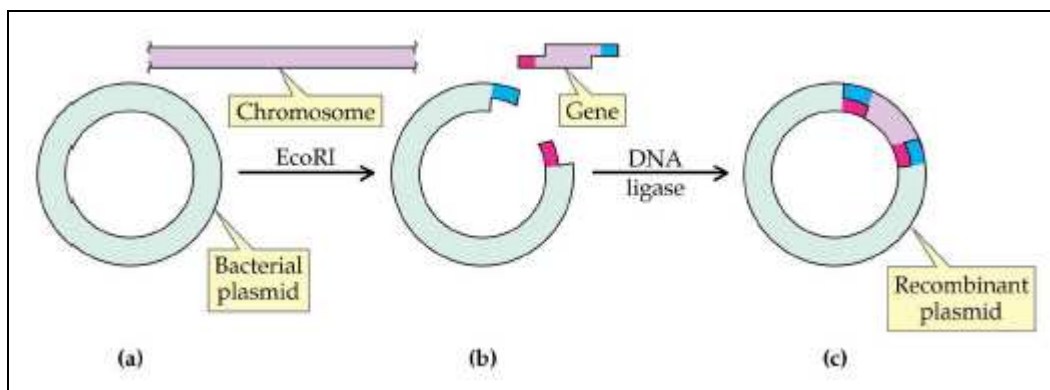
A 4. táblán néhány restrikciós endonukleáz tulajdonságai láthatók. Az első oszlopban a termelő mikroorganizmus neve szerepel. Az enzimek kódneve a mikroorganizmusból származik. (Pl.: Az AluI az *Arthobacter luteus* nevéből származik, az I szám az elsőnek izolált enzimre utal.)

A harmadik oszlopban látható, hogy milyen bázis szekvenciánál vágnak (a tükröképi bázissorrend miatt csak az egyik lánc szerepel). Felül láthatók azok, amelyek ún. tompa végeket (blunt end) hoznak létre, tehát egyszerre vágják el a két szálát. A lépcsős vonalak, pedig a ragadós végeket jelölik. A táblázat jobb oldalán az oszlopokban néhány gyakran használt vektor szerepel, a számok a darabolás utáni töredékek számát adják meg. Ha ez a szám több mint 50, az azt jelenti, hogy túlságosan apró darabokra vágja szét. Ha csak egy helyen vágja fel, pl. az SV40-es vírust, akkor az azt jelenti, hogy erre az egy helyre irányítottan be lehet vinni a géneket, és utána össze lehet kapcsolni. Tehát, ha valamilyen manipulációs eljárásra használjuk a restrikciós endonukleáz enzimeket, akkor az a jó, ha kevés helyen vágjuk fel a vektort. (Géntérképezésnél viszont az a jó, ha sok kis géndarabot kapunk, és abból lehet összerakni, hogy milyen volt az eredeti bázissorrend.)

Hogyan függ a vágási helyek száma a felismert DNS szakasz hosszától? Milyen gyakori a hasítás, ha négy bázispár hosszúságú szakaszt ismer fel az enzim? Ehhez ki kell számítani, hogy összesen hányféle kombináció lehetséges, és ezek közül egyetlen az enzim szubsztrátja. A DNS-ben 4 féle bázis van, tehát a szakasz első helyére választhatok 4-félét, a másodikra, a harmadikra és a negyedikre szintén 4-et, azaz összesen $4^4 = 256$ kombináció lehetséges. Statisztikusan tehát minden 256 bázispárra eshet egy vágási hely. Ez túlságosan

gyakori vágást, rövid fragmentumokat eredményez. A táblázatban is a 4 bázisos enzimeknél vannak az 50 fölötti számok.

6 bázis hosszúságú szakaszok esetében a kombinációk száma 4^6 , azaz 4096, tehát minden 4096. bázispárra jut egy vágási hely, ami sokkal hosszabb szakaszokat eredményez.



5. ábra: Génbeépítés plazmidokba

A plazmid vektor létrehozása:

Kiválasztjuk azt a kromoszomális DNS szakaszt, amely a bevinni kívánt gént tartalmazza. (Az 5. ábrán ez a lilás színű egyenes szakasz). Ezt egy kiválasztott restrikciós enzimmel pl. az EcoRI-gyel felvágjuk. Az így kapott DNS darab tartalmazza a célgént, és két ragadós vége van. A kromoszomális DNS darabolásával nem csak egyféle szakaszt kapunk, hanem sokfélé, és ezek közül ki kell válogatnunk a kívánt gént tartalmazót. Ezt szelektálni egy külön lépés az eljárásban.

Ugyanakkor a vektornak választott plazmidot is felnyitjuk ugyanazzal az enzimmal. Itt is ugyanolyan ragadós végek keletkeznek. Ha a kromoszomális DNS-t és a plazmid DNS-t összehozzuk, akkor megvan annak az esélye, hogy a ragadós végek úgy tapadnak össze, hogy a plazmid DNS-be betoldódik a kromoszomális megfelelő darabja. Itt ismét számos hibalehetőség van, a DNS darabok sok egyéb módon is rekombinálódhatnak, az ábrán csak a kívánt eset szerepel.

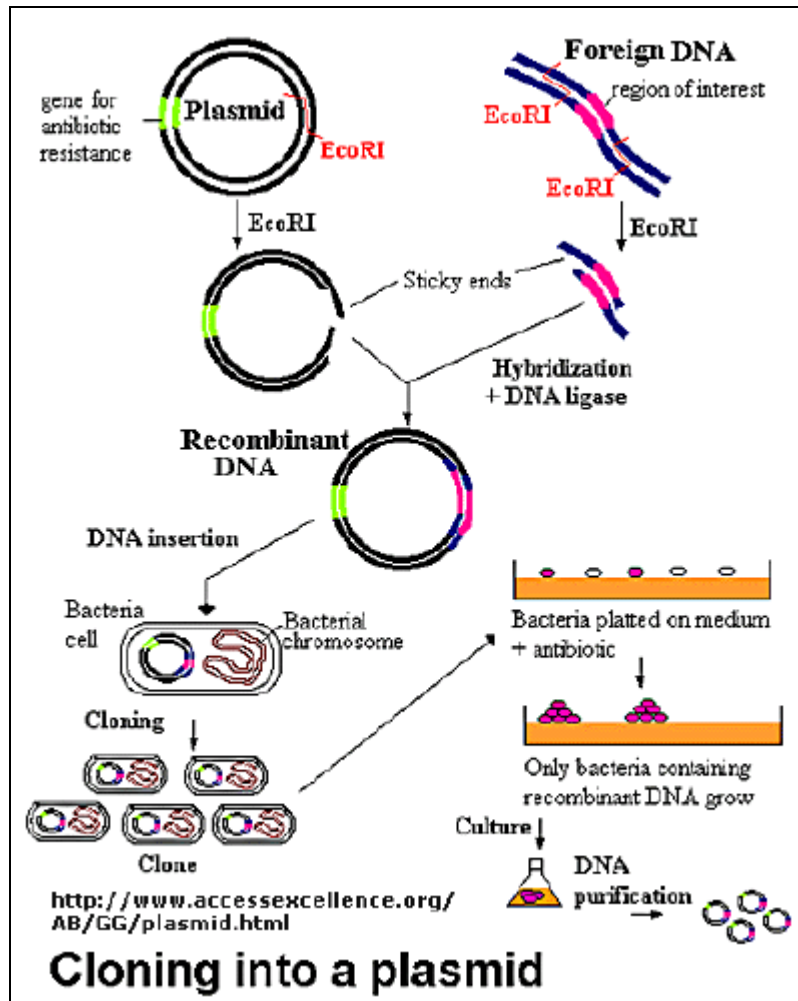
A ragadós végek csak a hidrogénkötéseket létesítenek, azaz gyenge, könnyen szétnyíló kapcsolatot. A cukor-foszfát láncok összekapcsolásához egy enzim (T4 DNS ligáz) hozzáadása szükséges. A ragadós végek lazán összeillesztik a láncvégeket, a ligáz erős kovalens kötéssel köti össze mindkét szálát. Ideális esetben kialakul az új gyűrűs DNS, az új plazmid. Ezt rekombináns (=újrakombinálódott) plazmidnak nevezik. Ezt kell a továbbiakban bevinni a sejtbe.

A bevétel megvalósításának módjai:

A plazmid az nem vírus, tehát nincs külön apparátusa arra, hogy bejusson egy sejtbe. (A vírus képes aktív behatolásra.) A plazmidnak segíteni kell, mert ez egy passzív DNS

darabka. A biotechnológusok elektromos hatásokkal, vagy vegyszeres kezeléssel „segítenek” a sejtfal és membrán megbontásában, és így a gyűrűs DNS-ek be tudnak hatolni.

Ha bejut a plazmid, akkor utána még mindig kérdéses, hogy működik-e vagy sem? Vajon osztódni fog-e a sejtekkel együtt a plazmid vagy sem? A kívánt gén mellé egy marker (nyomjelző) gént is beépítenek (pl. antibiotikum-rezisztencia), ami segít kiválasztani azokat a sejteket, ahol megtörtént a beépülés és „működik” a plazmid. Az adott antibiotikumot tartalmazó táptalajon csak rezisztenciagént (azaz a plazmidot) tartalmazó sejtek indulnak növekedésnek.



6. ábra: A teljes séma

A 6. ábra összefoglalja a teljes folyamatot. Kiindulásul rendelkezésre áll a plazmid és a kromoszomális DNS. A plazmidba már be van építve egy antibiotikum rezisztencia gén. A plazmidot és az idegen DNS-t (foreign DNS, kromoszóma DNS) is hasítjuk az EcoRI-gyel. Látható a kétféle DNS a ragadós végekkel (sticky ends). Összehozzuk őket egy oldatba, és a ragadós végekkel szépen összetapadnak, rekombinálódnak. A cukor-foszfát láncokat a DNS ligázzal kapcsoljuk össze. Létrejön a rekombináns plazmid, amiben benne van az idegen DNS darabka. Ezt a plazmidot bevisszük a sejtbe. A sejtben belül van a bakteriális kromoszóma (egy

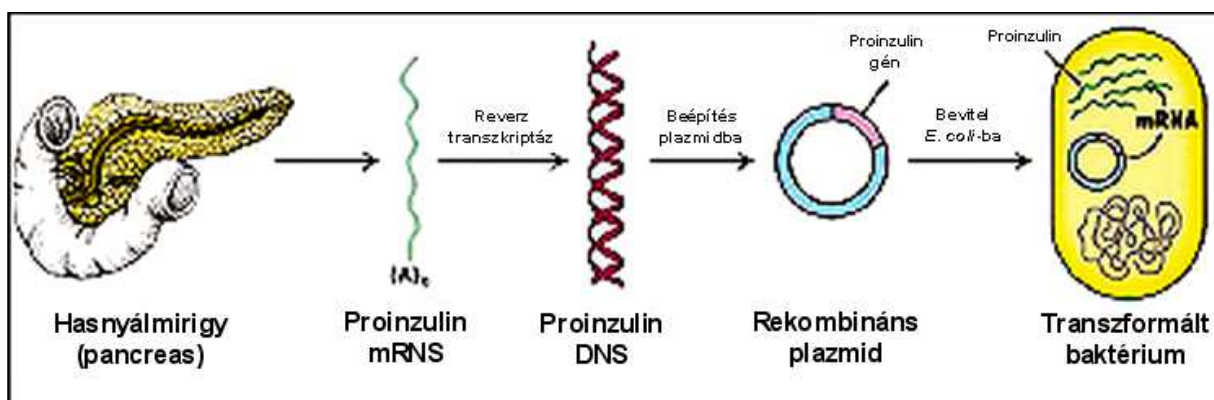
nagy DNS gyűrű) és mellette a kis plazmid részecskék (az ábra nem méretarányos). Ezután jön a szaporítás és szelekció folyamata. A sejteket ráviszik egy antibiotikumot tartalmazó szilárd táptalaj felületére (oldalnézetű Petri csészén láthatjuk). Azok a sejtek, amelyek a plazmidot tartalmazzák, azaz rezisztensek az antibiotikumra (lila színnel jelölve) elszaporodnak, látható telepet képeznek. Azok a sejtek, amelyekben nincsen meg a plazmid (fehérrel jelölve), azok nem nőnek ki, az antibiotikum hatására elpusztulnak. A telepeket átoltva megkezdhetjük a szaporítást és a bevitt fehérje termelését. A folyamatot szemléltető videó letölthető a tananyagok közül, a fájlnev: plazmid rekombináció.flv .

Hasonló elvű eljárással gyakorlatilag bármilyen gént be lehet vinni a prokariótákba és az eukariótákba is.

Mire jó ez a folyamat? A cél a fehérje termelés.

A gyógyászati célú fehérjék piaca óriási. Ezek lehetnek például hormonok, vakcinák (oltóanyagok a különféle betegségek ellen). Olyan enzimeket is lehet ilyen módon gyártani, amelyeket más módon nem lehetne. De lehet előállítani így immunfehérjéket, vérfehérjéket, pontosabban véralvadási faktorokat (ez is egy elég nagy piac)

Egy klasszikus példa:



7. ábra: Humán inzulin előállítása 1.

Az inzulin egy hormon, amely a szénhidrátok anyagcseréjének szabályozásában vesz részt. A szervezet sejtjei (az agysejtek kivételével) csak inzulin jelenlétében képesek felvenni a vérből a glükózt. Az inzulint a hasnyálmirigy (pacreas) egyes sejtjei termelik.

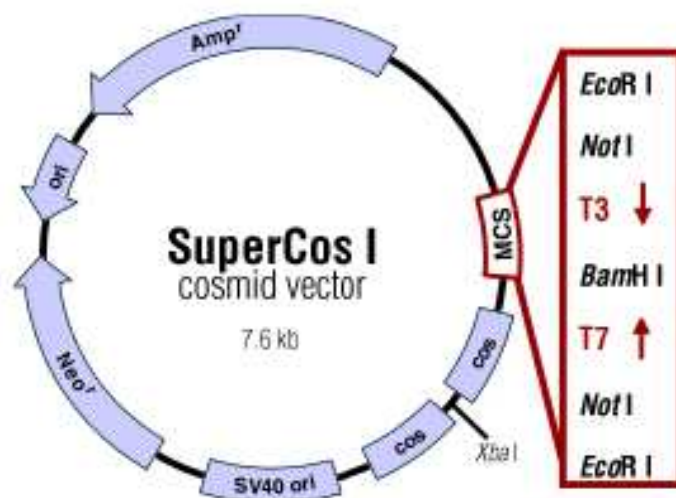
A rekombinációs folyamat célja, hogy az inzulint (ami fehérje típusú hormon) mikroorganizmusokkal is elő lehessen állítani.

Problémát okoz, hogy az emlős sejtekben a fehérje bioszintézis bonyolultabb folyamat, a mRNS érése során az intronok kivágására is sor kerül. A humán inzulin gén két intront, főlegesen szakaszt tartalmaz, ami a végső, érett mRNS-ben már nincs jelen. A prokarióták intron-kivágásra nem képesek, azaz ha az eredeti emberi inzulin gént ültetjük be,

akkor egy sokkal hosszabb, értelmetlen szakaszokat is tartalmazó fehérje képződne az inzulin helyett. A megoldás az, hogy nem DNS-ből indulunk ki, hanem az érett, „méreterre vágott” messenger RNS-ből. Ezt kell izolálni a sejtől, nem a kromoszómát. Ezután a mRNS alapján létre kell hozni a megfelelő DNS-t. Erre az RNS-vírusokból kinyerhető reverz transzkriptáz enzimek alkalmasak. Ezek szimpla szálú DNS-t szintetizálnak, külön lépés a másik DNS szál létrehozása. A kettős szálú DNS mindkét végére ragadós végeket kell kötni, és ezután következhet a rekombináció egy felnyitott plazmiddal, majd a bevitel a mikroorganizmusba, adott esetben *Escherichia coli*-ba. Érzékelhetjük, hogy ez egy soklépéses folyamat. Ezt a technikát alkalmazva a Genentech kutatói már 78-ban megoldották a gyártást, a piacon 1982-ben jelentek meg a rekombináns inzulinnal Humulin néven.

Eddig a prokarióták vektorairól volt szó, de gyakran az a feladat, hogy eukariótákba vigyünk be géneket. Az eukariótáknak megvannak a saját plazmidjaik és vírusaik, ezek ugyanolyan elvek mentén használhatók, mint az eddigiek. Sokszor viszont az a feladat, hogy baktériumokból kell átvinni géneket eukariótákba és vissza. Ehhez olyan vektorok kellene, melyek mind a két sejtípusban működnek. A természetben ilyen nem találunk, annyira más működésű sejtekről van szó. Az „idegen” vektorokat be tudjuk juttatni a sejtek belsejébe, de ezek ott nem képesek szaporodni, így a gének nem öröklődnek a sejtosztódás során.

A kulcs tehát a szaporodás. A másoláshoz a replikációs origóra van szükség. De a prokarióta replikációs origó az eukariótákban nem működik, és fordítva sem. Ezért a vektorba mind a kétféle replikációs origót be kell építeni. A másik nehézség az, hogy a szelekciós markerek is mások. A prokariótáknál bevált antibiotikum-rezisztenciák nem alkalmazhatók az eukariótáknál, ezért egy másik, az eukarióták körében működő antibiotikum-rezisztenciát (növényeknél herbicid-rezisztenciát, stb) is be kell építeni. Az ilyen, mindkét szervezetben működő vektort ingázó (shuttle) vektornak nevezik. Lényeges eleme tehát, hogy kétféle replikációs origót, és kétféle szelekciós markert tartalmaz.



8. ábra: Ingázó (shuttle) vektor

Található benne egy prokarióta replikációs origó (= **ori**). A másik, az **SV40 ori** egy majom vírus origója, amely emlős sejtekben működik. Két rezisztencia gén is van benne, az **Amp^R** az ampicilin rezisztencia (baktériumokra hat), a **Neo^R** pedig az eukarióta sejtekre. Az MCS (multiple cutting site) itt is a restriktív endonukleázok vágási helyeit jelöli.

A speciális növényi vektorokról:

Génátvitel Agrobacterium plazmidokkal

Az *Agrobacterium*-ok paraziták. A kétszikű növényeket fertőzik meg, szervezetükbe valamilyen növényi sérülésen keresztül hatolnak be. A betegség külsődleges megnyilvánulását a 9. ábrán láthatjuk, ez az ún. gyökérgolyva.

Az *Agrobacterium*-ok ezt nem a bakteriális mivoltukban teszik, hanem a plazmidjaik révén. Ezek a plazmidok sok millió éve együtt élnek az *Agrobacterium*-okkal, bonyolult biokémiai szimbiózis alakult ki az evolúció során.

9. ábra: *Agrobacterium* fertőzés = gyökérgolyva



Az *Agrobacterium*-oknak 4 fajuk van, ezek hatása kissé eltérő.

1. *Agrobacterium tumefaciens*:

A tume szó a tumorra, daganatra utal. A növénybetegség magyar neve gyökérgolyva, vagy koronagubacs. A sérülések helyén alakul ki fertőzés. A baktérium Ti (tumor indukáló) plazmidja nem differenciált szövet burjánzást idéz elő. A burjánzó sejtek olyan anyagokat (opalinokat) termelnek, amelyeket a baktérium tápanyagként felhasznál.

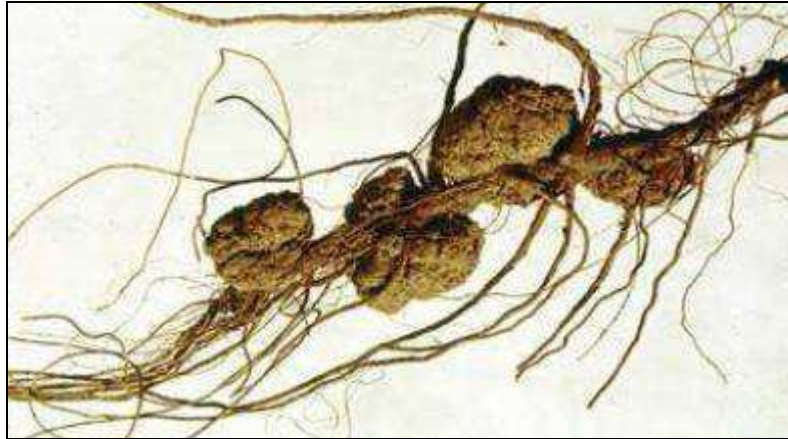
2. *Agrobacterium rhizogenes*:

Ennek RI (= root inducing) plazmidja vattaszerű hajszálgökér-burjánzást okoz.

3. *Agrobacterium rubi*: Gyümölcsfánál, málnánál gyökérgolyva, vesszőgolyva.

4. *Agrobacterium radiobacter*: Plazmidja nem okoz betegséget, viszont egy antibiotikumot (= agrocint) termelő gént hordoz. Ugyanezen a plazmidon található az agrocint elleni rezisztenciát biztosító gén is - megvédi saját magát.

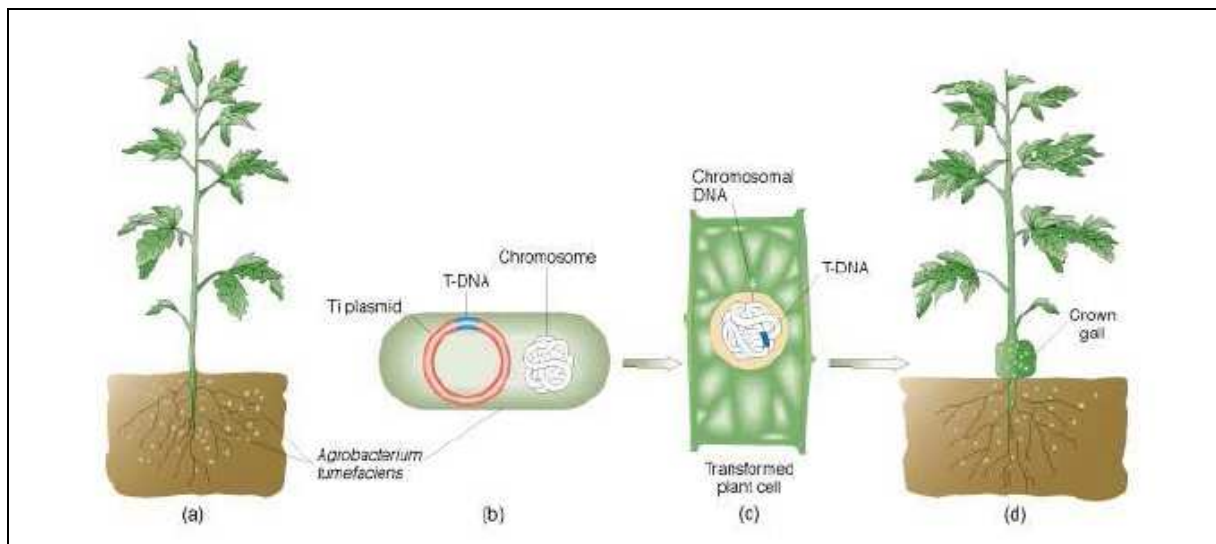
Az *A. tumefaciens* fertőzés



10. ábra: Az *A. tumefaciens* fertőzés

Ez a Gram-negatív növénypatogén talajbaktérium, a kétszikű növényeket (szerencsére a legfontosabb kultúrnövényeink nagy része egyszikű) a sebzési helyen megfertőzi és tumorokat okoz rajtuk. A baktériumok patogenitása összefügg a tumorindukáció (Ti) plazmid jelenlétével.

A Ti plazmid egy része (a transzfer DNS = T-DNS) a kórfolyamat során átkerül a növényi sejtbe és a sejtmag kromoszomális DNS állományába integrálódik. A T-DNS régióban helyezkednek el a tumorok kialakulásáért felelős gének.



11. . ábra: Az *A. tumefaciens* fertőzés 2.

A Ti (tumor indukáló) plazmid (pirossal jelölve) a T-DNS szakaszt (kézzel jelölve) beépíti a megfertőzött növény kromoszómájába. Ettől kezdve minden egyes osztódott növényi sejtben ez a kis DNS szakasz is megjelenik, a tumor minden sejtje tartalmazza.

Az *A. tumefaciens* elsősorban a gyökereket támadja meg. Ha a felszínen kerül bele egy sérülésbe, akkor is igyekszik lekerülni a gyökerekhez és ott kifejteni a hatását. Maga a baktérium sejt nem hatol be a növényi sejtbe, csak a növény sejtközötti folyadékával érintkezik. A növény életben marad, de életműködései, anyagcseréje megváltoznak.

A Ti plazmid

$1,2 \times 10^8$ molekulatömegű, gyűrű alakú DNS molekula. A baktériumban önállóan replikálódó genetikai egység. A plazmid DNS-nek van egy transzformáló (T-) DNS szakasza.

Ennek nagysága 20.000 bázispár, ez jut be a gazdasejtbe a fertőzést követően, majd stabilan beépül a növényi kromoszómába. A sejtburjánzás mellett olyan aminosav származékokat termeltet a növényvel, amelyeket az *Agrobacterium* tápanyagként hasznosít, emellett olyan növényi hormon analógok képződnek, amelyek a gyökér és a szárnövekedést leállítják, ezzel is előnyt adva a tumorsejtek növekedésének.

Génátvitel a Ti plazmiddal

A Ti plazmidok alkalmasak arra, hogy vektorként szolgáljanak „idegen” DNS szakaszoknak a gazdanövények kromoszómáiba történő beviteléhez. Ha a T DNS szakaszba a tumorindukáló gének helyére más géneket építenek be, akkor azok ugyanúgy beépülnek a növényi genomba. E rendszer felhasználásával a növények gyakorlatilag bármilyen génnel transzformálhatók.

A genomba juttatandó T-DNS szakaszokba általában marker (pl. rezisztencia) géneket is elhelyeznek, ami lehetővé teszi a transzformált növények egyszerű szelektálását.

A T-DNS felépítése

Határoló régiók: Ezek a T-DNS jobb és bal oldali végei, amelyek kromoszómába való integrálódásához nélkülözhetetlenek.

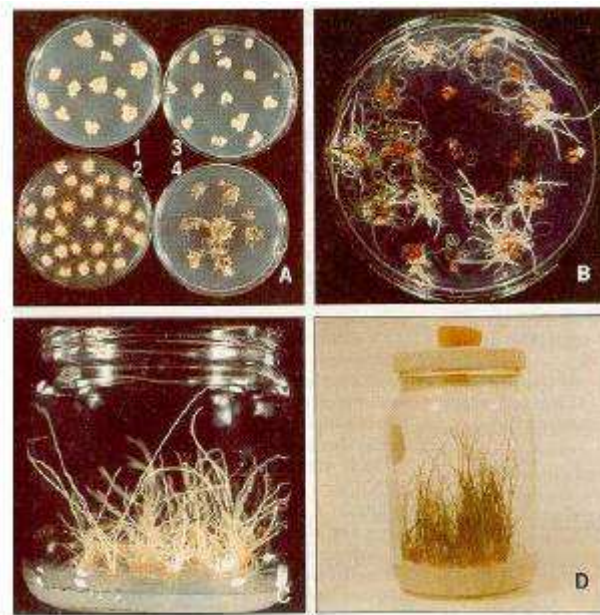
Ezen belül: Expressziós kazetta, az elején promóter, a végén terminátor régióval, melyek a gén működését, expresszióját (kifejeződését) teszik lehetővé.

Ezen belül helyezkednek el a célgén, a hasznos gén (egy hasznos növényi tulajdonság génje, amit be akarunk vinni a növénybe) és valamilyen szelektációs marker génje.

Növényregenerálás

A Ti plazmidokkal be lehet vinni a géneket a növényi sejtekbe, de ezek a gének nem jelennek meg az egész növényben, csak a tumorsejtekben és így nem öröklődnek.

Ahhoz, hogy öröklődő, minden sejtben megjelenő tulajdonságot kapjunk, ki kell emelni egy tumorsejtet és abból regenerálni a teljes növényt.



12. ábra: Növényregenerálás

A protoplaszt fúziónál már szó esett arról, hogy a növényeknél egy sejtből fel lehet nevelni az egész növényt. Ez érvényes a tumor sejtekre is, egyetlen sejtből szaporodóképes növényt lehet regenerálni.

Ha a regenerálási folyamatot végig csináljuk, akkor kapunk egy olyan növényt, amely minden egyes sejtjében, így az ivarsejtjében is hordozza azt a bizonyos génállományt, amit eredetileg a Ti plazmidba bevittünk. Láthatjuk, hogy sok-soklépéses folyamat eredményeként elértük, hogy a növény hordozzon egy ilyen gént. Milyen gént? Ami a növény minőségét, tartósságát, tűrőképességét javítja (pl. jobban tűri a szárazságot), ellenállóbb a kártevők ellen, rezisztensebb egyes vírusokra.

Az ábrán a folyamat fázisai láthatók. Először a tumorból kivett darabkákat Petri csészékben szilárd táptalaj felületére helyezik és szaporítják. Később ezeket differenciálódásra bírják, megjelennek a gyökerek. A B ábrán már kifejlett gyökereket láthatunk. Ez után pedig már befőttes üvegben nevelik a növényt, hogy fölfelé is növekedhessen, hajtást képezzen. A C felvételen a hajtások azért fehérek, mert alig van még zöld szintestük, a növény még nem a fotoszintézisből, hanem a táptalaj cukortartalmából nyer energiát. A D ábrán már zöld a növény, fotoszintézisre képes.