

# Baktériumok változékonysága, a genom evolúciója

## Baktériumok evolúciója

### Irányított evolúciós kísérletek

### Mutációk, reverziók, hibajavító mechanizmusok

### Genetikai információk átvitele

## 1. Bevezetés

A baktériumok változékonyságának legalapvetőbb mechanizmusa a baktériumok genetikai anyagának kémiai megváltozása, vagyis a **genotípus változása**.

A baktériumoknál a **fenotípus megváltozása** gyakran nem a genom kémiai megváltozásának eredménye, hanem azt a sejtek fiziológiai tulajdonságainak vagy életkörülményeinek megváltozása váltja ki. Ezeknek a fenotípusos adaptációs jelenségeknek a háttérében gyakran a gén-repressziók és derepressziók bonyolult szabályozási mechanizmusa rejlik. A fenotípusos flexibilitás, vagyis a baktériumok nagymértékű adaptációs képessége a genom információkészletének flexibilis és energiatakarékos felhasználását ill. működését tükrözi.

A genetikai háttér változása nélküli **fenotípusos eltérések** sokszor **kényszerű módosulásokat** tükröznek, pl. nem optimális tápközegben tokképzés, esetleg csilló nélküli formák, vagy lizozim hatására sejtfa nélküli formák megjelenése. Utóbbi két esetben a csilló ill. a sejtfa képzéssel kapcsolatos genetikai információ érintetlen a sejtben.

A fenotípusos módosulások másik csoportja, amikor **tényleges alkalmazkodás** a végeredmény, pl. nagy sókoncentrációhoz, antibiotikumokhoz, toxinokhoz, extrém pH értékhez. Az extrém körülmények közül ismét optimális körülmények közé kerülve, néhány generáció után visszatér a tolerancia az eredeti intervallumra.

Fenotípusos módosulás a jól ismert mechanizmusú **adaptív enzimképzés**, vagyis az indukálható transzkripció és transláció, mely bizonyos szabályozó vegyületek megjelenésének, vagy éppen eltűnésének a következménye (ökonomikus anyagcsere).

A fenotípus módosulásától eltér a **genotípus módosulása**, hiszen ilyenkor mindig a genom kémiai megváltozásáról van szó. A genom kémiai megváltozása létrejöhet fizikai hatásra, ill. kémiai ágensek hatására, vagy más DNS molekulákkal történő kölcsönhatásra.

A fizikai, vagy kémiai hatásra bekövetkező maradandó módosulásokat a genomban, **mutációknak** nevezzük.

DNS-DNS kölcsönhatásból eredő genom módosulásokat **DNS-rekombinációnak** nevezzük.

## 2. Evolúciós kísérletek baktériumokkal

A genom megváltozását és annak szerepét irányított evolúciós kísérletekben lehet tanulmányozni. Ezek során egy bizonyos baktériumpopulációt, vagy több baktérium vegyes tenyészetét olyan anyagcsere feladatra kényszerítünk, melyre eredetileg, a kiinduló fenotípus képtelennek bizonyult. A kényszerítő erő a szelekciós nyomás.

Ezeknél a kísérleteknél feltételezzük, hogy a természetes evolúció során szerepet játszó mechanizmusok a laboratóriumi kísérletekben hasonlóképpen lejátszódnak. Különösen fontos szerepük lehet ezeknek a kísérleteknek a szennyezett környezeti elemek (víz, talaj, üledék) által kiváltott genetikai változások, a baktériumoknak a szennyezettség által kiváltott, felgyorsult evolúciója vizsgálatokor.

Az ilyen típusú vizsgálatok eredményei leggyakrabban azt mutatják, hogy amikor a baktériumok új anyagcsere-funkciókra tesznek szert, ennek mechanizmusa mindössze egyetlen, vagy néhány mutációs lépést jelent, melyek vagy már meglévő enzimek produkciós sebességét befolyásolják, vagy korábban is létező, de nyugvó gének megnyilvánulására hatnak, esetleg az enzimek felépítését, vagy a transzportrendszerek specifikitását érintik. Az ilyen mechanizmusok útján szerzett új tulajdonságok, anyagcsere funkciók megjelenésének az alapja, hogy a genomban már eleve olyan genetikai információk vannak jelen, melyek már közel megfelelnek a megoldandó feladatnak. Ilyenkor a genetikai kódban már viszonylag kicsiny változások a szervezet anyagcsere kapacitásának lényeges módosulását válthatják ki. Ezek a mechanizmusok főleg a finomabb környezeti változásokhoz való alkalmazkodást teszik lehetővé.

A környezet szelektív nyomása hatására létrejött azon genetikai változások esetén, melyek során egy új szubsztrát hasznosításának, vagy valamely toxikus anyag tűrésének képessége jelenik meg, mind a szabályozó szakaszokat, mind pedig a struktúrgéneket érintik a változások.

Gyakori, hogy egy új enzim génje a baktérium genomjában nyugvó állapotban van jelen, s ahhoz, hogy ismét képes legyen megnyilvánulni, mutációra van szükség. A genomban nagy mennyiségű meg nem nyilvánuló genetikai kapacitás van, mely bizonyos fokú genetikai plaszticitást biztosít, mely az evolúció szempontjából előnyös, hiszen néhány mutációs lépéssel új anyagcsere-kapacitáshoz lehet jutni. A genom nyugvó részének replikációjára fordított energiát kompenzálhatja a anyagcsere-kapacitásban rejlő előny.

A DNS-DNS kölcsönhatásokon alapuló adaptáció vizsgálatára is alkalmasak az evolúciós kísérletek. Francia kutatók ilyen kísérletekkel bizonyították pl. egy klórozott szénhidrogének bontásában szerepet játszó plazmidnak a szennyezett talajban való elterjedését a klórozott szénhidrogén koncentráció-, mint szelekciós nyomás hatására. A kísérletben olyan génmanipulációval előállított baktériumokat juttattak a talajba, melyekbe az említett géneket plazmidhoz kötve építették be. A talajban követve a manipulált baktériumok sorsát, azt találták, hogy azok 24 -48 óra leforgása alatt elpusztultak. Viszont a sejtekbe épített plazmidok kimutathatók voltak a talaj endogén mikroflórájához tartozó baktériumokban.

A baktériumok evolúciójában fontos szerepet játszó valamennyi mozgékony genetikai elem hatását, szerepét és sorsát követni lehet ilyen jól megtervezett evolúciós kísérletekben, melyek folyamatát a legmodernebb géntechnikai módszerekkel lehet követni.

### 3. A mutáció

A **mutáció molekuláris szintű értelmezése** során a gén nukleotidszekvenciájában bekövetkező változásról beszélünk, mely a kódolt fehérje strukturális és működésbeli megváltozását vonja maga után. A változás két módja: 1. hiba csúszik a replikációba, 2. a DNS cukorfoszfát láncra megszakad.

A **spontán mutációk** során általában pontmutáció jön létre. A fő szerepet a bázisok tautomer átalakulása játssza.

**Indukált mutációk** esetén a mutagén ágensek vagy a bázisok tautomerizációjának mértékét növelik meg, vagy más módon idézik elő a replikáció során a normálisan össze nem illő bázispárok összekapcsolódását. Pl. ha a DNS-be timin helyett 5-bróm-uracil épül be, ennek tautomer alakja sokkal gyakoribb, mint a timiné. Mutagén ágensek még az alkilezőszerek, melyek a bázisokat alkilezése révén okoznak téves párosodást. Az akridinfestékek a DNS bázispárjai közé ékelődve új bázispárok beépülését idézi elő. Sugárzások okozta mutációk esetében gyakori a pirimidinbázisok között kialakuló kovalens kötések, melyek hiányokat okoznak a kiegészítő fonál szintézisében.

**Szupresszormutációknak** nevezzük azt, melynek során egy előzetes mutáció által már inaktívált gén működőképességének visszaállítása megy végbe. Vö. revertánsok és back-mutáció.

Jellegzetes pontmutáció a baktériumoknál **hőmérséklet érzékenység** megjelenése. Ilyenkor a mutáció a genomban csak kis mértékű változást idéz elő, mely változás a fehérje aktivitását normális hőfokon nem befolyásolja, viszont extrém körülmények között, pl. magas hőmérsékleten a nem tökéletes szekvenciájú fehérje konformációját úgy módosítja, hogy az már nem tud eleget tenni feladatának, biológiai aktivitását megváltoztatja, vagy megszünteti.

**A mutációk következményei a sejtben**, hogy megváltozik a genom, melyet a megfigyelhető tulajdonságok (morfológiai, fiziológiai, kulturális, pl. enzimaktivitásbeli) jeleznek.

A mutáció lehet nyereséges (gain mutation), vagy veszteséges (loss mutation).

A nyereséggel járó mutációknál, pl. ha egy addig nem termelődött enzim termelő képességét idézi elő, akkor a genetikai változás késés nélkül megjelenik a fenotípusban.

A veszteséges mutációknál kicsit más a helyzet, ott mindig van időeltolódás a genotípusban kialakult helyzet és a fenotípusban megmutató tulajdonság között. Pl. egy enzim termelésének megszűnése csak késve mutatkozik meg, a korábban megszüntetett enzimtartalom megvan, aktív, és a sejtek osztódása alkalmával feleződik, tehát a szaporodás során kihígul, hat generáció után kb. az eredeti koncentráció 1 %-a lesz jelen az utódokban.

**A mutáció a sejt populáció szintjén** a mutáns gyakorisággal és a mutáció rátájával jellemezhető. A mutáns gyakoriság a mutánsok aránya egy populációban, értéke  $10^{-5}$  és  $10^{-10}$  között

változhat. A mutáció rátáját mutáció/sejt/generáció egységben fejezzük ki, ami megadja, annak a valószínűségét, hogy a sejt egyszeri kettéosztódása során egy mutáció fordul elő.

A mutációt követő **szelekció** a mutáns és a nem mutáns sejtek generációs ideje közti különbség miatt is megtörténhet, természetesen nem mindig a kívánatos irányba. A kísérletekben általában un. abszolút szelekciót alkalmaznak, vagyis olyan körülményeket teremtenek, mely csak a mutánsoknak kedveznek, a nem mutánsok elpusztulnak, vagy növekedésük gátolt.

**Az antimutagenézis** összefoglaló néven a mutációk ellen ható tényezők és történések összességét értjük, pl. a hibajavító rendszerek működését, vagy a mutáció fenotípusban való megjelenését akadályozó okokat. Antimutagenézisről beszélünk akkor, is, ha a egy anyag, vagy hatás a mutációk számát csökkenti. Megkülönböztethető fiziológiai és genetikai antimutagenézis. Első esetben a sejtek olyan fiziológiai állapotúak, hogy nem képesek mutálódni, pl. nem szaporodnak. A második esetben valódi, genetikai szinten végbemenő történésekkel állunk szemben, pl. allélek, vagy hibakiküszöbölő gének működésével.

**Antimutagén ágensek** (fiziológiai antimutagenézis) a purinnukleozidok, a koffein, a mangánionok, az L-metionin, spermin és más poliaminok, aktinomicin-D, bázikus fukszin. A gének represszált állapota is antimutagén hatásnak tekinthető.

**Genetikai háttérű antimutagenézis** a sejtekben működő hibakiküszöbölő mechanizmusokra vezethető vissza. Érdekes, hogy a DNS hibajavítás-deficiens (hiányos) baktériumokban az UV-mutagenézis nemhogy nem nő, de csökken. Ennek oka, hogy az UV hatására bekövetkező nem letális mutációk tulajdonképpen közvetve, a tévesen dolgozó javítórendszer által kisebb hibákkal helyreállított genom változásai.

**A DNS hibamentes javításának mechanizmusai** un. konvencionális hibajavító rendszerekkel történik. Az E. coli UV hatásra létrejövő timin-dimerjeinek széthasogatásán három különböző mechanizmusú enzimrendszer is dolgozhat:

1. Fotoreaktivációs mechanizmus: az enzimet, mely a pirimidinbázisok dimerjeit elhasítja a látható fény aktiválja.
2. A sötétben javítás mechanizmusában négy működésében egymáshoz kapcsolódó enzim végzi: egy specifikus endonukleáz, mely a dimert kivágja a DNS-ből, a létrejött rést egy exonukleáz kitágítja, a hiányt a DNS-polimeráz az ép fonalat templátként használva kipótolja, végül egy ligáz enzim újra összeköti a szabad végeket.
3. A replikáció során a testvér DNS duplexek közötti rekombinációval is kiküszöbölhető a hibás szakasz. Specifikusan jelzett szülői DNS kovalens beépülését tapasztalták leányfonalakba UV-sugárzást követő DNS replikáció és posztreplikációs javítás után. Előfordul a hiányos leányfonalak posztreplikációs egyesítése is és a hiányzó szegmentek pótlása.

**SOS-hibakiküszöbölést** E.coliban tanulmányozták legtöbbit. Ez az előbbieken leírt hibamentes hibakiküszöböléshez képest igen nagy hibaszázalékkal működő rendszer, tehát a DNS-t nagy valószínűséggel hibásan kijavító rendszer. Ez a hibára hajlamos kiküszöbölő rendszer két módon vesz részt a DNS javításában: az egyik a hosszú szakaszú kimetszéses javítás, a másik a chloramfenikol érzékeny posztreplikációs javítás.

A nem károsodott sejtekben az SOS-hibakiküszöbölő rendszer represszáva van, azonban UV-sugárzás hatására aktiválódik. Nemcsak az UV-sugárzás, de más mutagén és karcinogén anyagok hatására is aktiválódik a rendszer. A mutagén, vagy karcinogén ágensek szabályozó jelet váltanak ki (SOS-jel), mely komplex indukciós folyamatot kezdeményez. A folyamat során különböző, koordináltan működő SOS-funkciók derepresszálódnak. Ezek tulajdonképpen a túlélést segítik elő, mint egy életmentő műtét. A hibajavító aktivitáson kívül megjelenik a sejtosztódás késleltetése, bizonyos exonukleázok aktivitásának gátlása, vagy a DNS szintézis újratelezése a kromoszómális origónál. Olyan DNS polimerázok is működésbe léphetnek, melyek a hibás (timin-dimer) DNS fonal replikációját képesek folytatni, igaz, hogy igen nagy hibaszázalékkal.

Sértetlen, replikációra képes DNS-sel rendelkező, teljesen ép sejtekhez SOS hibakiküszöbölést gerjesztő aktivitású pl. UV-sugárzott E. coli sejt kivonatot teszünk, akkor a nem besugárzott populációban is megnövelhető a bázisok hibás beépítésének gyakorisága, tehát megnövekedett mutációs rátát eredményez.

#### **4. Az információcsere módjai és feltételei a prokariótáknál**

A rekombináció lehetséges módjai baktériumoknál:

1. Idegen DNS-ek transzmembrán felvételére visszavezethető **transzformáció**
2. Bakteriofágok segítségével a géneknek a donorsejtből a recipiensbe történő **transzdukciója**
3. **Szexuális** folyamatokkal analóg és plazmidok (F-faktor) segítségével végbemenő géncsere.

(Ezek jelentését, lefolyását, jellemzőit korábbi tanulmányok alapján kell tudni)

#### **A transzformáció a természetben**

A recipiens oldott állapotban veszi fel a donor DNS-ét. A transzformáló DNS-t egyes fajok spontán bocsátják ki, pl. nyálkaanyagukban, de gyakoribb, hogy az elpusztult sejtekből válnak szabaddá.

Transzformációra azok a sejtek képesek, melyek nagy molekulású anyagokat képesek felvenni (kompetencia).

A genetikai rekombináció további feltételei, hogy a résztvevő sejtek közeli rokonok legyenek, hogy a restriktív modifikációs rendszerük kompatibilis legyen és hogy a rekombinációhoz szükséges DNS párosodás, vagyis a homológ DNS szakaszok szoros összetapadása megtörténhessen. A DNS párosodás nagyfokú homológitást tételez fel. Csak ezután következhet a gének kicserélődése.

A természetes transzformáció a sejt normális anyagcseréjének része, a folyamat funkciói a kromoszómán kódoltak, a kompetencia pedig a szelektív nyomástól függően megjelenő, örökletes tulajdonság. A transzformáció jelenlétét a természetben az alábbiak valószínűsítik, ill. befolyásolják:

1. Nukleinsavak minden környezeti elemében előfordulnak, talajokban, üledékekben felgyülemlekednek, a humuszanyagokhoz kötődve stabilizálódnak. Ilyen állapotban a nukleázokkal szemben ellenállóak, tehát a kompetens sejtek számára rendelkezésre állhatnak.
2. Az oldott DNS jobban transzformál, mint a szilárd részecskék felületéhez kötöttek.
3. A szabad DNS-nek a baktérium környezetében jelentős tartózkodási időre van szüksége, hogy a transzformáció realizálódjék.
4. A felvevő sejt kompetenciája átmeneti és több tényezőhöz kötött tulajdonság.
5. A baktériumok sejtfalon át történő DNS-leadása több faj esetében bizonyított.

## **Plazmidok, vagyis extrakromoszómálisan örökített replikonok**

Fajtai: szexfaktorok: pl. E. coli F-faktora

col-factorok: colicin termelésért felelős géneket tartalmazó plazmidok. A colicinek a koliformokra letális fehérjetermészetű toxinok

rezisztencia faktorok: antibiotikum rezisztenciáért felelős géneket tartalmaznak  
penicillináz plazmid, Staphylococcusoknál: fág közvetítéssel jutnak át egyik sejtől a másikba.

A plazmidok transzferje sejtről sejtre több mechanizmus szerint történhet.

1. Konjugáció során a plazmid képes saját transzferjét elvégezni
2. Szexpíluson keresztül: a pílus speciális fehérjefonalakból álló képződmény, szintéziséért a plazmid felelős. A két sejt ezen keresztül kerül kontaktusba. A plazmid egyik fonala az egyik, másik fonala a másik sejtbe kerül. A transzferrel párhuzamosan megtörténik a DNS komplementerével való kiegészülése. A transzfer után megtörténik a cirkularizáció.

Epizómának nevezzük azokat a plazmidokat, melyek a gazdasejt kromoszómájába képesek integrálódni.

Az átvitelre képes plazmid mobilizálhatja az önátvitelre nem képes plazmidokat, vagy úgy, hogy azzal összekapcsolódva segíti annak átjutását a píluson, vagy úgy, hogy átadja a mobilitáshoz szükséges géneket a korábban önátvitelre nem képes plazmidnak. Egyes plazmidok mag a kromoszómát is képesek mobilizálni, ilyen az F-faktor.

A plazmidok elvesztése és transzfer útján való visszanyerése az a két folyamat, melynek egyensúlya a baktérium populációban egy alacsony százalékban, de fenntartja a plazmidokat. Ha az egyensúlyt megzavarja a szelekciós nyomás, pl. magas antibiotikum koncentráció, a plazmidok hirtelen elterjednek a teljes populációban.

A plazmidok transzmisszióját a pílusképzés gyakorisága limitálja. A plazmidok megfelelő körülmények között transzformációval is átjuthatnak egyik sejtől a másikba.

## **A laboratóriumi gyakorlat menete**

A gyakorlat során szennyezett talajban lejátszódó adaptációs folyamatokat fogunk laboratóriumi méretben modellezni.

Tiszta és kismértékben szennyezett talajok adaptálhatóságát vizsgálunk iszapreaktorokban.

A környezetben leggyakrabban előforduló és legveszélyesebb szerves és szervetlen mikroszennyezők közül a nehézfémek és az ásványi olajok hatását vizsgáljuk.

Növekvő fém- ill. ásványolajkoncentráció hatását követjük az időben a szennyezőt tűrő baktériumtörzsek koncentrációjának mérésével.

A nehézfém (réz és cink) koncentrációt hetenként 100ppm, az ásványolaj koncentrációt hetenként 10 000 ppm értékkel növeljük. A szennyező mellé tápsóoldatot is adagolunk az iszapreaktorokba.

A toxikus anyagokat tűrő ill. bontó baktériumpopuláció vizsgálata és a sejtszámok meghatározása határhígításos ill. lemezöntéses technikával történik. Az adaptáltatott talajt tartalmazó reaktorokból kivett mintákat a kontrollhoz viszonyítjuk.

A nehézfém-tűrés és ásványolajbontás tulajdonságának antibiotikumrezisztenciához kapcsolt voltát is vizsgáljuk, mérve és összehasonlítva az antibiotikumrezisztencia tulajdonság gyakoriságát az adaptáltatott és a kontroll kísérletekben.

Az adaptálódott sejtek számát hetenkénti vizsgálattal követjük. A megindított kísérletet hetenként másik csoport értékeli, a legvégén minden csoport megkapja a többiek eredményét és az egész kísérleti időszakra vonatkozó értékelést is ad.

A vizsgálatok menete:

1. Nehézfém-tűrő sejtek száma
2. Olajbontó sejtek száma
3. Antibiotikum-tűrő sejtek száma

Beadandó: jegyzőkönyv: elméleti alapokkal, a mérés menetével, saját eredményekkel, teljes időszakra vonatkozó összehasonlító eredményekkel.

### **Ajánlott irodalom:**

1. Szabó István Mihály: A bioszféra mikrobiológiája, 1988. Akadémiai Kiadó, Bp.
2. Watson, Toozee és Kurtz: A rekombináns DNS, 1988. Mezőgazdasági Kiadó, Bp.