

Dr. Papp István¹, Dr. Hollósy Ferenc², Dr. Szentesi Margit³

Utazás a rekombináns géntechnológia körül

A géntechnológia kifejezés alatt számos olyan eljárást értünk, amelyek az 1970-es évek második felétől kezdődően forradalmasították a biológiai tudományokat. E technológiák segítségével a sejt genetikai információit meg tudjuk változtatni oly módon, hogy a sejt örökítő anyagába máshonnan – akár más fajból – származó DNS szakaszt ültetünk be. Ezért nevezzük a génszabás eljárást DNS rekombinációs technológiának.

A rekombináns technológia alapját azok az eljárások képezik, amellyel a felhasználni kívánt genetikai anyagot izolálják, különböző méretű szakaszokra vágják, majd szekvenálják. Ezt követően pedig behelyezik egy olyan kémiai hordozó egységbe, a „plazmidvektorba”, amely lehetővé teszi a felszaporítani kívánt DNS szakaszok egy gazdaszervezetbe történő bejuttatására (transzfektálás). A gazdaszervezet (általában baktérium, pl. *Escherichia coli*) szaporodásával a bejuttatott DNS-szakasz együtt replikálódik, amelynek révén nagymennyiségű specifikus DNS-szekvenciát lehet előállítani további felhasználás céljából.

Ez a röviden vázolt eseménysor a klónozás folyamata, amelynek első lépése a donor (baktérium, gomba, növény, állat, ember) DNS szekvenciájának gondos kiválasztása és enzimekkel történő darabolása. Általában úgy választják ki a hasítandó DNS-szakaszt, hogy tartalmazza azt a gént (vagy annak egy részét) amelyet „munkára” (pl. fehérjeszintézisre) szeretnénk fogni. A daraboláshoz használt „molekuláris ollók” ún. restriktív endonukleáz enzimek, amelyek specifikus helyeken hasítják a DNS-t, és olyan nukleinsav szekvenciákat eredményeznek az elhasított szakaszok végein, amelyeket ragadós végeknek nevezünk. A ragadós végek palindrómák, vagyis a DNS olyan egyszálú nyitott végei, amelyek más hasonló palindrom szekvenciákkal könnyedén alkotnak bázispárokat. Amennyiben tehát a hordozó plazmidvektort és a vizsgálni kívánt DNS-szekvenciát is ugyanazzal a restriktív enzimmal

emésztettük, a létrehozott ragadós végeket a ligáz enzimek, mint valamilyen „molekuláris ragasztók” könnyedén összeillesztik a komplementer bázispárosodás szabályainak megfelelően. Ma már több mint 3000 restriktív enzimet ismerünk, mindegyikük meghatározott DNS-szekvencia felismerésére és metszésére „szakosodott”.

A klónozendó DNS szakaszok alapvetően két forrásból származhatnak: egyrészt az adott élőlény sejtmagjának genomikus DNS-éből vagy egy mesterségesen előállított komplementer DNS-ből, a cDNS-ből. Ez utóbbit úgy állíthatjuk elő, hogy az adott DNS szakaszról rendszeresen átírt messenger (hírvívő) RNS-t (mRNS) templátként (mintaként) felhasználva a reverz transzkriptáz segítségével cDNS szálakat készítünk. A folyamat kulcsa a reverz transzkriptáz enzim, amely az mRNS-ből komplementer DNS-szálat szintetizál. A reverz transzkriptáz egy olyan enzim, amely főleg RNS tumorvírusokban fordul elő és a genetika központi dogmájának nevezett (DNS→RNS→PROTEIN) útvonalat megfordítja: azaz RNS-ből DNS-t hoz létre. Amennyiben az így létrejött RNS-DNS hibridet denaturáljuk és DNS-polimerázzal, primert és nukleotidokat is tartalmazó közegbe helyezzük, kettős szálú cDNS-t állíthatunk elő, amely alkalmas tervezett rekombináns DNS készítésére.

A rekombináns géntechnológia elsődleges fegyverei tehát: a restriktív endonukleázok, a reverz transzkriptázok és a DNS-ligázok. Ezek a „szabás, varrás, visszairás és ragasztás” eszközei.

Az idegen genomba történő beépülés, átprogramozás és szaporodás „nagy mesterei” a vírusok. Nem csoda, hiszen ezek teljes egészében erre specializálódtak.

A vírusok vektorként juttatják be saját génjeiket a megtámadott sejt genomjába, és kényszerítik a gazda sejtet a vírus megsokszorozására. A vektornak legalább három fontos képességgel kell rendelkeznie ahhoz, hogy sikeres legyen önmaga klónozásában: az egyik ilyen fontos tulajdonság a gazdaszövet kiválasztása, ahová az üzenetet el kell juttatnia; ha a célpont már megvan, akkor képesnek kell lennie a restriktív helyre való beintegrálódásra; és végül el kell indítania az autonóm replikációt

soklépéses folyamatát. A lambda-fágok ilyen vektorok. Olyan gént hordoznak, amelyek képesek akár 20 kilobázis (vagyis meglehetősen nagy) DNS-szakaszokat hordozni és beépíteni.

A fágokkal szemben a prokarióták körkörös DNS-sel rendelkeznek. Mivel nincsen maghártyával körülvett sejt-magjuk (a maganyag közvetlen kapcsolatban áll a citoplazmával), ebből adódóan könnyedén magukba építenek olyan kisméretű ún. szemecirkuláris, extrakromoszomális DNS-szakaszokat (plazmidokat), amelyek 5 kilobázisnál (5 kb) kisebb méretűek. Ezek a plazmidvektorok természetes úton, de mesterséges módon is beépülhetnek a baktérium DNS-ébe és a kiépülő pseudopodiumok révén továbbadhatják egymásnak az antibiotikum-rezisztenciaért felelős gén(ek)e)t. Az adott plazmidot felvevő baktériumok gyorsan szaporodnak, és genetikailag azonos sejtekből álló kolóniát (klónvonalat) adnak, amelyben minden egyes sejt ugyanazt a rekombináns üzenetsomagot tartalmazza.

A lambda bakteriofágoknál sokkal nagyobb szakaszok beépítésére képesek a mesterséges élesztő kromoszómák (YAC-ok), amelyek 1000 kb hosszúságú DNS-szakaszokat hordoznak, és meglehetősen könnyedén beépülnek az élesztősejtekbe. A YAC-típusú mesterséges kromoszómára azért van szükségünk, mert viszonylag egyszerűen kezelhetőek és az eukarióta gének beépüléséhez hasonlóan könnyedén beépülnek a genomba.

A DNS-könyvtárak olyan restriktív fragmentum-gyűjtemények, amelyekben a klónok a megfelelő génszakasz(ok)ot tartalmazzák. Jelenlétük komplementer próbaanyaggal (tesztanyaggal) hibridizáció útján azonosítható és elkülöníthető.

A próbaanyagok általában radioaktív izotóppal (³²P) jelölt szintetikus egyszálú oligonukleotidok (általában 20-30 bázis hosszúságúak), amelyek autoradiográfiával könnyen kimutathatók. A denaturált egyszálú DNS-ek (vagy RNS-ek) keverékében ugyanis az oligonukleotidok csak a velük komplementer szekvenciát jelölik meg, azaz csak azzal hibridizálnak. Az alábbiakban dióhéjban ismerkedjünk meg a legfontosabb rekombináns DNS kimutatási, azonosítási technikákkal.

Dr. Papp István¹, Dr. Hollósy Ferenc²,
Dr. Szentesi Margit³

¹Százhalom Egészségi Központ, Százhalombatta

²PRG Kft.

³Budai Irgalmasrendi Kórház, Budapest

A blottolás

A blottolási eljárások képesek szeparálni és detektálni a nukleinsav szekvenciákat illetve proteineket egy komplex keverékben. Ezekben az elektroforézisen alapuló technikákban a molekula mérete és töltése az, ami a szeparációt lehetővé teszi.

A Southern-blot: a DNS-t detektál. Képes a milliányi fragmentumokból egy specifikus szakaszt azonosítani.

A Northern-blot: RNS-t detektál. Annak meghatározására alkalmas, hogy egy specifikus mRNS kifejeződik-e egy bizonyos szövetben (tehát folyamatban van-e az átírás).

A Western-blot: antitestek segítségével proteineket detektál. Egyben használható azoknak a transzkripció faktoroknak (és expressziójuknak) detektálására, amelyek kapcsolatba lépnek egyes specifikus gének szabályozó szekvenciáival.

PCR

A polimeráz láncreakció (PCR) egy másféle, ám igen hatékony eljárás, amely arra alkalmas, hogy egy adott DNS-szekvenciát nagyon kis mintamennyiség esetén is sokszorosítsunk. Ehhez a felszaporítandó DNS-szakasznak két ismert szekvenciájú hely között kell elhelyezkednie. A folyamathoz szükséges komponensek: két közrefogó hellyel komplementer egyszálas oligonukleotid primer; hőstabil DNS-polimeráz (mely funkcióképes marad a hőkezelési fázisokban, Taq-polimeráz); négyféle dezoxiribonukleozid-trifoszfát (dNTP-k). A felszaporítandó DNS-szekvencia minden egyes melegítési-hűtési ciklusban megkétszereződik, és néhány ciklus múlva már DNS-molekulák óriási mennyisége áll rendelkezésünkre.

Az RNS-vírusinfekció már korai stádiumban detektálható az RT-PCR módszerrel. A jó öreg „visszairó enzim”, a reverz transzkriptáz segítségével a vírus RNS-genomja „visszairható” DNS-sé, amelynek mennyisége PCR segítségével felerősíthető és Southern-blottal azonosítható.

A HIV (AIDS) vírus, enterovírus és a Norwalk vírusinfekciók szintén diagnosztizálhatók az RT-PCR módszerrel, mielőtt szignifikáns vírusreplikáció (vagy detektálható antitest-termelés) beindult volna. Egy sor öröklődő betegség mutáns alléljei detektálhatóak PCR-analízissel. Ilyen a cisztás fibrozis (AR rendellenesség), amelyet a fenil-alanin kódoló és három bázisra

kiterjedő bázis-hiányt (mutáció) okoz a CFTR génben. Olyan próbaanyagok használatosak, amelyek közrefogják a CFTR-mutált régiót. Kimutatható, hogy normális, hordozó vagy érintett (beteg) személytől származik-e a DNS. Southern-blot során a patológiás 151-es bázispár szakaszok gyorsabban mozognak, mint a normális 154-bp termékek. A homozigóták sávjai kétszer akkorák, mint a heterozigótáké.

Hasonló módon, PCR-analízissel detektálható genetikai betegségek: familiáris hiperkoleszterinémia, a hemofília, a Lesch-Nyhan szindróma, lizoszomális és glikogéntárolási betegségek; a retinoblasztóma, a sarlósejtes anémia, a béta-talasszémia és a von Willebrand-féle betegség.

A restrikciós fragmentum-hosszúság polimorfizmusok (RFLP-k) az általános populációban észlelhető kicsi, örökölhető variációk a DNS-szekvenciában. A humán genomban a variációk 200-500 nukleotidonként előfordulnak, de nem okoznak fenotípusos hatásokat, mert nagyrészt nem kódolnak fehérjé-

ket. Ezek a variációk feltérképezhetők restrikciós enzimekkel és Southern blot eljárással. Az RFLP-k az öröklődő betegségek detektálásának alapját képezik; a tandemismétlődések képezik az alapját a DNS-ujlenyomatnak. A mutáns allélek is detektálható, amelyek együtt járnak bizonyos polimorfizmussal. A sarlósejtes hemoglobin (HbS) hátterében olyan mutáció áll, amely megváltoztatja a restrikciós helyet a génen belül; ezáltal az RFLP-analízis képes megkülönböztetni az érintett, a hordozó és normál személyeket. Az RFLP családja (pedigré) analízisre is alkalmas, hiszen képes feltárni a betegség-hordozó mutációt egy családon belül.

Irodalomjegyzék:

1. Pelley JW, Goljan EF. *Biokémia*. Medicina, 2003.
2. Papp I és mtsi. *Utazás a vírusok koponyája körül*. Praxis 2010. 19. évf. 10.szám
3. Papp I. *Isten összenyomta a 2-es kromoszómát, és a majomból ember lett*. Hippocrates, 2010. 2. szám
4. Papp I és mtsi. *A radiosynoviorthesis és a kromoszóma-aberrációk*. Praxis 2010. 19. évf, 5. szám.

Szaladnak a spermák?*

Nagy költőnkre hivatkozva („vétkesek közt cinkos, aki néma”) azért háborgok, mert a nyelvrontók egyre szaporodó gyakorisággal nevezik a spermiumokat spermának. Ezt a vétséget betegek, orvosok, andrológusok, állítólagos szakértők és gyógyszerismertetőik fokozódó gyakorisággal követik el, még szakmai kongresszusokon is. Íme, néhány példa.

Vétkes betegek

Mit tanulhattak biológiából azok a férfiak – és tanácsadó orvosokkal levelező feleségeik –, akik nem tudják, hogy a sperma (ondó) fő részét a néhány milliliter spermaplazma alkotja, továbbá az abban úszkáló sok millió spermium (ondósejt)? Elkészerítő választ kapunk a Google-tól. Néhány idézet. „A sperma szám növeléséről valaki tud valamit?” „Nagyon kevés a sperma számom.” „A férjemnek 30 millió a sperma száma.” „A szervezetem ellenanyagot termel a spermák ellen.” „12,6 millió az életképes sperma.” Aligha kap tanácsot az az asszony, akinek a férje leletében „a sperma motilitása 27,9”. A csúcs: „A férjemnek nem volt sperma az ondójában.”

Vétkes tanácsadó orvosok

Nem mindig a betegek a hibásak e két szó, a sperma és a spermium jelentésének összekeverésében. A tanácsot adó orvosok, pl. a Nők Lapja és az InforMed szakértői, nem magyarázzák meg a kérdezőknek a tévedés lényegét, sőt, átveszik a hibás szót, és maguk is hibásan használják. A butaság terjedéséért az orvosok is felelősek. Az a belgyógyász is, aki homeopátiás szert javasol a „spermaszám növelésére”, az az andrológus meg fokozottan, aki az azoospermiát „spermahiánynak” véli. Némi vigaszt jelent, hogy egy-két beteg már figyelmeztette a levelezőtársait a helytelen szóhasználatra.

Vétkes kutatók, tudós orvosok, állatorvosok

A világháló segítségével csak hatévnyi késéssel került a szemem elé az a – neves vidéki egyetemünkön írt – értekezés, amelyet előzetesen sok hozzáértő szakembernek kellett látnia, hiszen a PhD volt a tét. Nem a kötőjel miatt háborodtam föl a „sperma-motilitás mérésének” olvasásakor, hanem azon, hogy magas színvonalú értekezésben is el lehet követni ekkora hibát, még hozzá sokszor. E „kis” felületesség miatt hajlamos vagyok kétségbe vonni az elismerésre méltóan nagy tudományos eredményeket.

Híres állatorvosi kutatóintézetek pályáztak olyan pénzért, amelyet „sperma-motilitás vizsgálatára” kívántak fordítani. Mások azzal foglalták össze az eredményeiket, hogy az „A- és E-vitamin nem javította a sperma motilitását és morfológiáját.” Kutatási téma volt a „sperma mozgásának időtartama” is. Ironikus megjegyzésem: a saját erejéből mozgásra képtelen sperma addig mozog, amíg az inszeminátor lötyögteti. E hibás értelemben használt szavak megjelentek az állatorvosi rendelőkben is, hiszen az egyik a komplex andrológiai vizsgálatai között a „számtógépes sperma motilitás” vizsgálatát reklámozza.

Vétkes cégek

Egyik gyógyszercég magyar nyelvű ismertetőjében olvasható, hogy az angliai királyi kórház a szelén hatá-

sát vizsgálta a „sperma motilitására.” (Enyhíti a hibát, hogy zárójelben hozzátették: az ondósejtek vándorlási képességére.)

Linezolid hatóanyagú gyógyszer preklinikai vizsgálatának szempontjai között megtalálhatjuk a „sperma-motilitást” is. „Spermaképző tubulusokról” is tudósítanak. Kimutatták, hogy „dutaszterid szedése mellett csökkent a spermaszám, az össz-spermaszám, az ondótérfogat és a spermiumok motilitása”, de „nem változott a sperma koncentráció és a sperma morfológiája”. A mesalazin végbélkúp mellékhatásai között van a „csökkent sperma szám.” Teljesen zagyva a Q10 koenzim hatását ismertető mondat („javíthatja a sperma motilitását, ennek normálértéke 50/ml”), hiszen a nem létező spermamotilitásnak, de még másnak sincs ilyen referenciaértéke. A gyógyszereken kívül árusítanak olyan készüléket is, amely a „sperma motilitás vizsgálatára” alkalmas, vagy olyan otthoni tesztet, amelynek „elvégzése megmutatja, ha alacsony az ivarsejtek száma a spermiumban.”

Vétkes hivatalnokok vagy A szakértők

A sperma szó hibás használata akkor kezd igazán járványszerűen terjedni, amikor a hivatalnoki nyelvben is megjelenik. Kiváló alkalmat kínálnak az Európai Unió angol nyelvű állásfoglalásainak magyar, netán közlönyben megjelenő fordításai. „Spermát kell gyűjteni a mellékhere farki részéből vagy az ondóvezetékéből, amelyet a spermamotilitás és -morfológia vizsgálatára kell használni. Ideje leszögeznünk: sperma nincs a férfi testében, a spermának meg olyan alakja van, amilyen edénybe tesszük.

Legfőbb vétkes az angol sperm

Valószínű, hogy ezekért a magyar orvosi nyelv ellen elkövetett bűnökért az ondót, magot is jelentő angol 'sperm' a főfelelős. Angol nyelvű szakirodalomban gyakori és elfogadott a sperm count, sperm motility, sperm morphology. Hogyan definiálják ezekben a sperm jelentését az angol szótárak?

– Sperm: *Tiny organisms in a man's semen that can swim up a woman's vagina and fertilize an egg.* Sperm count: *a measurement of how many sperm are contained in a man's semen.*

– „Total sperm count, or total sperm number, is the total number of spermatozoa in the entire ejaculate.”

– A magyar értelmező szótár meghatározása szerint a „sperma a hím ivarmirigyek termékenyítő váladéka.”

Világos: az angol sperm magyarul spermiumot (is) jelent, ellenben a magyar sperma ondót jelent, vagyis nem azonos a spermiummal. Akkor sem, ha néhány hazai andrológus(!) honlapján – a felfedezésére váró – spermiumtenyésztés is olvasható.

Édes anyanyelvünk már így is eléggé elangolosodott. Ne vegyük át ezeket a hibás, félreérthető angol kifejezéseket! Ezt mindazoknak tudniuk kellene, akik saját céljukra vagy mások okítására angol szöveget fordítanak magyarra. Nem lehet megbecsülni, hány orvosnak, állatorvosnak, gyógyszerésznek és újságírónak kellene most szégyenkezve elpirulnia.

Dr. Berényi Mihály

* A Magyar Orvosi Nyelv c. folyóiratban megjelent közlemény alapján