

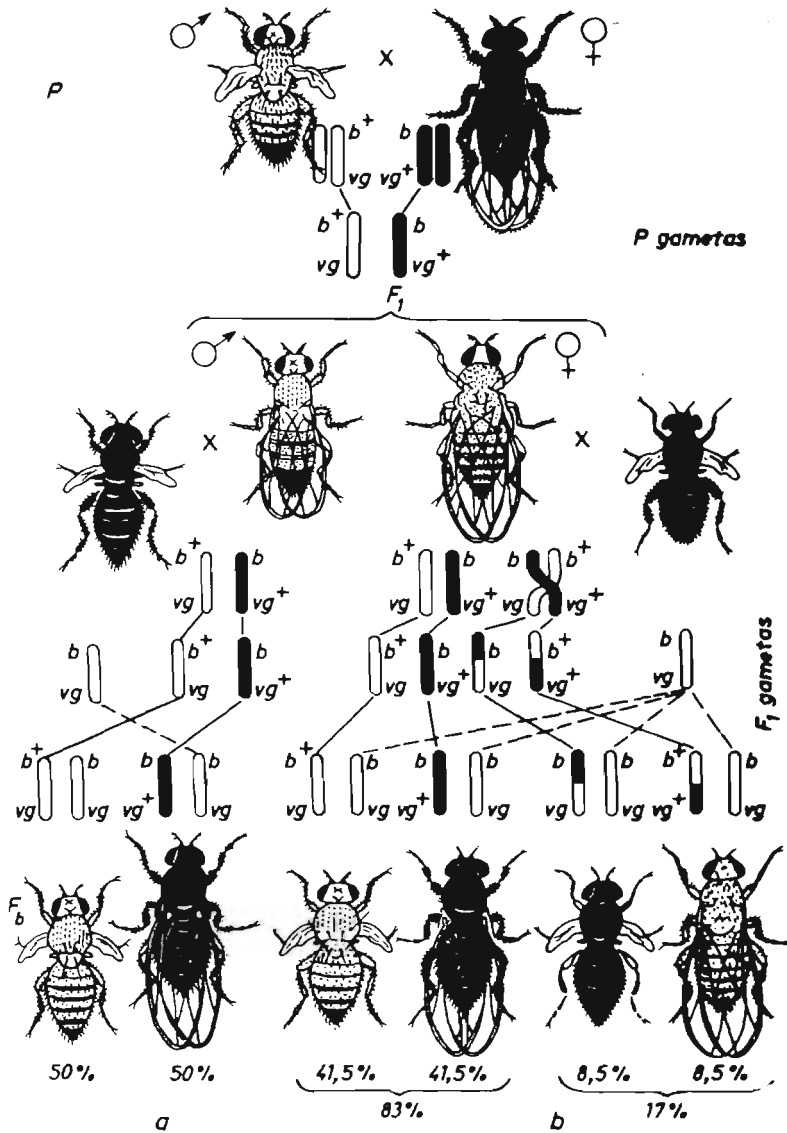
## 4. GĒNU REKOMBINĀCIJA

Cilvēka, kukurūzas un peles šūnas kodolā atrodas apmēram  $10^5$  dažādu gēnu. Salīdzinot ar gēnu skaitu, hromosomu ir visai maz: cilvēkam — 23, pelei — 20 un kukurūzai — 10 pāri. Tātad vienā hromosomā jāatrodas ļoti daudziem gēniem. Citologs V. Setons, kas sīki izpētīja mejozes norisi taisnspārņiem, jau 1902. gadā norādīja, ka trešā Mendēļa likuma darbībai jābūt ierobežotai, jo gēni, kuri atrodas vienā hromosomā, droši vien nevar brīvi kombinēties un iedzimst kopā.

Vienā hromosomā lokalizēto gēnu saistīto iedzimšanu nosaka gēnu saistība. Gēnu saistība parādās tādejādi, ka vairākas pazīmes, kas kopā bijušas vienam no hibrīda vecākiem, kopā izpaužas arī hibrīda pēcnācējiem. Šādu «pazīmju pievilkšanos» atklāja 1906. gadā Anglijā V. Betsons un R. Pennets. Kādā eksperimentā viņi krustoja divas puķzirnīšu *Lathyrus odoratus* formas: vienai bija purpursarkani ziedi un ovāli ziedputekšņi, otrai — sarkani ziedi un apaļi ziedputekšņi.  $F_2$  paaudzē ieguva  $\frac{3}{4}$  pēcnācēju ar purpursarkaniem un  $\frac{1}{4}$  ar sarkaniem ziediem, tāpat  $\frac{3}{4}$  augu ar ovāliem un  $\frac{1}{4}$  — ar apaļiem ziedputekšņiem. Uzskaitot augus pēc abām pazīmēm reizē, neieguva attiecību  $\frac{9}{16}:\frac{3}{16}:\frac{3}{16}:\frac{1}{16}$ . Vecāku fenotipi (purpursarkani ziedi ar iegareniem putekšņiem un sarkani ziedi ar apaļiem putekšņiem) parādījās daudz biežāk, nekā tas būtu sagaidāms pēc trešā Mendēļa likuma. Autori toreiz šai parādībai nedeva izskaidrojumu, uzskatot to tikai par interesantu izņēmumu.

### 4.1. HROMOSOMĀLĀS IEDZIMTĪBAS TEORIJAS RAŠANĀS

Hromosomu sakaru ar iedzimtību pierādīja tikai 1910. gadā T. Morgans, A. Stertevantis un K. Bridžess, veicot drozofilas krustošānu. Kādā no eksperimentiem drozofilu, kurai bija savvaļas tipa (pelēka) ķermeņa krāsa un rudimentāri spārni, krustoja ar mušu, kurai bija melns ķermenis un normāli spārni (4.1. att. a, b).  $F_1$  paaudzē visām mušām bija pelēka ķermeņa krāsa un normāli spārni. Izdarot analizējošo krustošānu ar abu vecāku recesīvo pazīmju nesēju (melns ķermenis, rudimentāri spārni), ieguva negaidītus rezultātus. Ja krustošānai izvēlējās  $F_1$  tēviņu, viņa pēcnācējiem bija tikai tādas abu pazīmju kombinācijas kā viņa vecākiem: pelēks ķermenis ar rudimentāriem spārniem vai arī melns ķermenis ar normāliem spārniem attiecībā 1:1 (it kā abas pazīmes noteiktu viens un tas pats gēns). Krustojot  $F_1$  mātīti ar tēviņu, kam bija abas



4.1. att. Ķermeņa krāsas (*b* gēna) un spārnu garuma (*vg* gēna) iedzimšana drozofilai:

a — bez krustmijas, b — ar krustmiju, kas notikusi starp gēniem *b* un *vg*.

recesīvās pazīmes, parādījās ne tikai vecākiem bijušās pazīmju kombinācijas, bet arī jaunas, taču  $F_2$  skaitliskās attiecības neatbilda dihibrīdiskās analizējošās krustošanās skaldīšanās attiecībām (1:1:1:1). Vecāku pazīmju kombinācijas parādījās daudz biežāk (kopā 83%) nekā jaunās kombinācijas jeb rekombinācijas (kopā 17%).

Pilnīgo saistību starp ķermeņa krāsu un spārnu garumu T. Morgans izskaidroja ar to, ka gēni, kas nosaka šīs pazīmes, atrodas vienā hromosomā. Lai attēlotu šo gēnu savstarpējo novietojumu, tos raksta virs vai zem vienas kopējas svītras. Melnu ķermeņa krāsu nosaka recesīvais gēns  $b$  (angļu *black* — melns), bet pelēku —  $b^+$ ; rudimentārus spārnus — recesīvais gēns  $vg$  (angļu *vestigial* — aizmeties), bet normālu —  $vg^+$ .

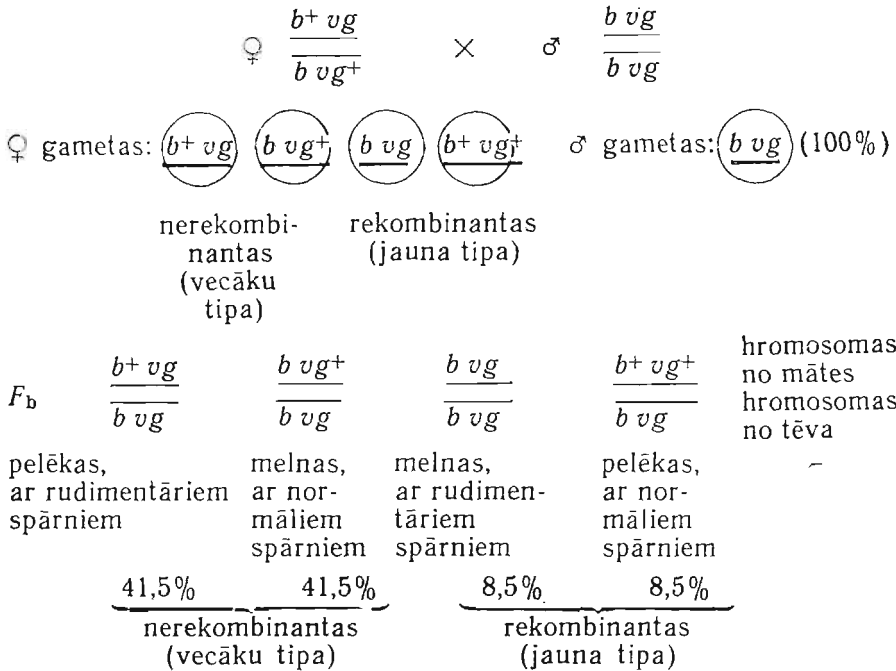
$$\begin{array}{ccc}
 P & \frac{b^+ vg}{b^+ vg} & \times & \frac{b vg^+}{b vg^+} \\
 & \text{pelēka,} & & \text{melna,} \\
 & \text{ar rudimentāriem} & & \text{ar normāliem} \\
 & \text{spārniem} & & \text{spārniem} \\
 P \text{ gametas} & \left( \frac{b^+ vg}{\quad} \right) 100\% & & \left( \frac{b vg^+}{\quad} \right) 100\% \\
 F_1 & & \frac{b^+ vg}{b vg^+} & 
 \end{array}$$

visas pelēkas, ar normāliem spārniem

Analizējoši krustojot  $F_1$  tēviņus, iegūst:

$$\begin{array}{ccc}
 \sigma & \frac{b^+ vg}{b vg^+} & \times & \text{♀} \frac{b vg}{b vg} \\
 & \text{pelēks,} & & \text{melna,} \\
 & \text{ar normāliem} & & \text{ar rudimentāriem} \\
 & \text{spārniem} & & \text{spārniem} \\
 \sigma \text{ gametas} & \left( \frac{b^+ vg}{\quad} \right) 50\% & \left( \frac{b vg^+}{\quad} \right) 50\% & \text{♀} \left( \frac{b vg}{\quad} \right) 100\% \\
 F_2 & \frac{b^+ vg}{b vg} & \frac{b vg^+}{b vg} & \text{hromosomas no tēva} \\
 & \text{pelēka,} & \text{melna,} & \\
 & \text{ar rudimentāriem} & \text{ar normāliem} & \\
 & \text{spārniem} & \text{spārniem} & \\
 & 50\% & 50\% & 
 \end{array}$$

Analizējošās krustošanas reciprokaajā variantā (izmantojot  $F_1$  mātītes), pēc T. Morgana domām, nedaudzie rekombinanti varēja rasties tikai tad, ja dažos mātēs šūnu kodolos (šajā gadījumā — 17%) homologiskās hromosomas ir apmainījušās ar iecirkņiem:



Procesu, kura rezultātā notiek saistīto gēnu apmaiņa starp homologiskām hromosomām, T. Morgans nosauca par krustmiju jeb krosingoveru. Krustmijas teoriju netieši atbalstīja arī citologu pētījumi. Jau 1909. gadā F. Jansenss, novērojot salamandras spermatogēnēzi, sīki aprakstīja profāzes I stadijas un izteica domu, ka hiasmu veidošanās diploīdā izskaidrojama ar to, ka šajā laikā notiek apmaiņa ar homologisko hromosomu iecirkņiem. Bija zināms arī, ka drozofilu tēviņiem hiasmas neveidojas, bet mātītēm — veidojas.

Izpētot daudzas drozofilas pazīmes, izrādījās, ka tās visas var iedalīt četrās grupās. Dažādu grupu pazīmes iedzimst savstarpēji neatkarīgi (brīvi kombinējas), bet vienas grupas pazīmes iedzimst saistīti. Drozofilai ir astoņas hromosomas jeb četri hromosomu pāri. No tā var secināt, ka četras saistības grupas atbilst četrām dažādām hromosomām. T. Morgans pieņēma (1910. gadā), ka gēni, kas atrodas vienā hromosomā, veido vienu saistības grupu. Visām līdz šim ģenētiski izpētītajām organismu sugām (cilvēkam, pelei, drozofilai, zīdvrēpējam, kukurūzai, tomātam, miežiem, zirņiem u. c.) gēnu saistības grupu skaits tiešām ir vienāds ar hromosomu haploīdālo skaitu (vai arī mazāks par to, ja sugas ģenētika vēl nepilnīgi iz-

pētīta, piemēram, trusim ir zināmas tikai 11 saistības grupas, bet hromosomu haploidālais skaits ir 22). Prokariotiem, kam ir tikai viena hromosoma, visi gēni veido vienu saistības grupu.

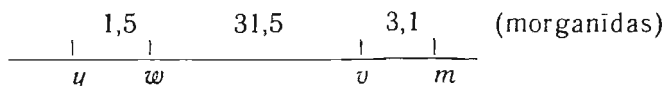
Izrādījās, ka starp diviem saistītajiem gēniem krustmija notiek ar pastāvīgu biežumu. Šo biežumu izsaka (procentos) kā rekombinanto pēcnācēju kopējā skaita attiecību pret visu pēcnācēju skaitu, kas iegūti heterozigotas analizējošajā krustošanā. A. Stertevants 1911. gadā atklāja t. s. aditivitātes likumu — krustmijas biežumu starp diviem gēniem var aprēķināt kā divu citu gēnu krustmijas biežumu summu vai starpību, līdzīgi ģeometriskajiem attālumiem starp punktiem, kas atrodas uz vienas taisnes a b c:

$$bc = ac - bc \text{ vai } ac = ab + bc \text{ utt.}$$

Kā piemēru apskatīsim rekombinācijas biežumu starp četriem gēniem, kas atrodas drozofilas X hromosomā jeb I saistības grupā: *y*, *w*, *v*, *m*. Dažādos krustojumos iegūts šāds rekombinācijas biežums starp apskatāmajiem gēniem:

Gēnu pāri	Rekombinācijas biežums
<i>y</i> — <i>w</i>	0,01500 (1,5%)
<i>y</i> — <i>v</i>	0,33022 (33,0%)
<i>y</i> — <i>m</i>	0,36155 (36,2%)
<i>v</i> — <i>m</i>	0,03130 (3,1%)
<i>w</i> — <i>v</i>	0,31500 (31,5%)
<i>w</i> — <i>m</i>	0,34627 (34,6%)

A. Stertevants secināja, ka gēni hromosomās izvietoti lineāri, bet krustmijas biežums starp tiem atspoguļo to savstarpējos attālumus — jo attālums starp gēniem ir lielāks, jo biežāk var notikt krustmija. Tātad gēns hromosomā ieņem noteiktu vietu — lokusu. Vēlāk pēc padomju ģenētiķa A. Serebrovska ierosinājuma atstatumu starp lokusiem, kurš dod vienprocentīgu krustmiju (1% rekombinantu analizējošā krustošanā), pieņēma par rekombinācijas mērvienību un nosauca par morganiādu. Ārzemju literatūrā to sauc par centimorganiādu. Augstāk apskatīto četrus gēnu izvietojumu drozofilas X hromosomā shematiski var attēlot šādi:



Krustmija var notikt jebkurā hromosomas vietā. Visbiežāk, it īpaši īsās hromosomās, tā notiek vienā punktā, bet var vienlaicīgi notikt arī divos vai pat trijos punktos, ja vien hromosoma ir pietiekoši gara. Ja krustmija notiek vienā punktā, to sauc par vienkāršo, ja divos, — par divkāršo, ja trijos, — par triskāršo krustmiju. Ja heterozigotā krustmija kādā hromosomas iecirknī notiek

divas reizes, tad šī iecirkņa galapunkti atgriežas sākotnējā stāvoklī un indivīds fenotipiski pieskaitāms nerekombinantajiem:

$$\frac{A}{a} \frac{B}{b} \times \frac{A}{a} \frac{B}{b} \xrightarrow{\text{vienkāršā krustmija}} \frac{A}{a} \frac{b}{B}$$

$$\frac{A}{a} \frac{B}{b} \times \frac{A}{a} \frac{B}{b} \xrightarrow{\text{divkāršā krustmija}} \frac{A}{a} \frac{B}{b}$$

Divkāršo krustmiju var pierādīt, ja novēro kādu trešo gēnu, kas atrodas starp diviem iepriekš aplūkotajiem:

$$\frac{A}{a} \frac{G}{g} \frac{B}{b} \times \frac{A}{a} \frac{G}{g} \frac{B}{b} \xrightarrow{\text{divkāršā krustmija}} \frac{A}{a} \frac{g}{G} \frac{B}{b}$$

## 4.2. HROMOSOMU KARTES

A. Stertevanta atklātais aditivitātes likums parādīja, ka ar ģenētiskās analīzes palīdzību ir iespējams spriest par ģenētiskā materiāla organizāciju šūnā. Pieņemsim, ka kādam organismam iegūta jauna mutanta pazīme ( $\delta$ ) un mūsu uzdevums ir noteikt šo pazīmi determinējošā gēna atrašanās vietu genomā. Darba sākumā nosaka, kādai saistības grupai pieder pētāmā pazīme  $\delta$ . Šim nolūkam nepieciešams, lai pētnieka ricībā būtu indivīdi, kuriem katrā saistības grupā jau ir pa zināmam recesīvam gēnam — t. s. iezīmētājgēnam. Iegūst  $F_1$  hibrīdus starp pētāmās mutācijas nesējiem  $\delta\delta$  un iezīmētājgēnu  $aa$ ,  $bb$  utt. nesējiem.  $F_1$  hibrīdus savstarpēji krustojot, iegūst  $F_2$ . Ja gēns atrodas citā saistības grupā nekā iezīmētājgēns  $a$ , tad  $F_2$  novēros skaldīšanas atbilstoši trešajam Mendela likumam:

$$P \quad \frac{\delta}{\delta} \frac{a^+}{a^+} \times \frac{\delta^+}{\delta^+} \frac{a}{a}$$

pētāmais mutants                      indivīds ar iezīmētājgēnu

$$F_1 \quad \frac{\delta}{\delta^+} \frac{a^+}{a} \times \frac{\delta}{\delta^+} \frac{a^+}{a}$$

$$F_1 \text{ gametas } \frac{1}{4} \left( \frac{\delta}{a} \right) + \frac{1}{4} \left( \frac{\delta^+}{a} \right) + \frac{1}{4} \left( \frac{\delta}{a^+} \right) + \frac{1}{4} \left( \frac{\delta^+}{a^+} \right)$$

$$F_2 \quad \frac{9}{16}\delta^+a^+ + \frac{3}{16}\delta^+aa + \frac{3}{16}\delta\delta a^+ + \frac{1}{16}\delta\delta aa$$

Ja gēns  $\delta$  atrodas vienā saistības grupā, piemēram, ar gēnu  $b$ , tad šādu indivīdu  $F_2$  skaldīšanas attiecībā  $\frac{9}{16} : \frac{3}{16} : \frac{3}{16} : \frac{1}{16}$  nenovēro. Ja saistība starp gēniem ir pilnīga (krustmija nenotiek),  $F_2$  skaldās kā monohibrīdiskajā krustojumā —  $\frac{3}{4} : \frac{1}{4}$ , bet, ja notiek krustmija, parādās gan vecāku pazīmju kombinācijas, gan arī rekombinācijas.

Kad atrasts, kādai saistības grupai pieder gēns  $\delta$ , var noskaidrot tā atrašanās vietu hromosomā. To var izdarīt tikai attiecībā pret kādiem citiem šīs hromosomas gēniem, nosakot krustmijas biežumu to starpā. Ja eksperimentatora rīcībā ir divi zināmi gēni, piemēram,  $b$  un  $c$  no šīs saistības grupas, tad analizējamais gēns var atrasties 1) starp  $b$  un  $c$ ; 2) ārpus posma  $bc$ , gēna  $b$  pusē; 3) ārpus posma  $bc$ , gēna  $c$  pusē. Vispirms pēc trim gēniem —  $\delta$ ,  $b$  un  $c$  iegūst triheterozigotu:

$$\begin{array}{l}
 P \quad \frac{\delta b^+c^+}{\delta b^+c^+} \quad \times \quad \frac{\delta^+b c}{\delta^+b c} \\
 F_1 \quad \frac{\delta b^+c^+}{\delta^+b c} \quad \text{triheterozigota}
 \end{array}$$

Triheterozigotu analizējoši krusto ar trīskāršo recesīvo homozigotu (analizatoru):

$$\frac{\delta b^+c^+}{\delta^+b c} \quad \times \quad \frac{\delta b c}{\delta b c}$$

Tā kā analizatoram veidojas tādas gametas, kas satur tikai recesīvās visu triju gēnu alēles, tad pēcnācēju ( $F_2$ ) fenotipu nosaka tikai to hromosomu gēnu sastāvs, kuras viņi saņēmuši no triheterozigotas. Ja notikusi krustmija, tad iegūst astoņas  $F_2$  fenotipiskās klases:

- $\delta b^+c^+$  un  $\delta^+b c$  — nerekombinanti,
- $\delta b c^+$  un  $\delta^+b^+c$  — rekombinanti, pārkruojums noticis starp  $\delta-b$  un  $b-c$ ,
- $\delta b c$  un  $\delta^+b^+c^+$  — rekombinanti, pārkruojums noticis starp  $\delta-b$ ,
- $\delta b^+c$  un  $\delta^+b c^+$  — rekombinanti, pārkruojums noticis starp  $b-c$ .

Rekombinantu skaitu  $F_2$  izdalot ar kopējo  $F_2$  indivīdu skaitu, iegūst rekombinācijas biežumu starp attiecīgajiem diviem gēniem. Divkāršo rekombinantu skaitu pieskaita gan vienam, gan otram vienkāršo rekombinantu skaitam. Gēns  $\delta$  atrodas starp gēniem  $b$  un  $c$ , ja rekombināciju biežums starp  $b$  un  $c$  ir vienāds ar rekombināciju biežumu summu starp  $b$  un  $\delta$  un starp  $\delta$  un  $c$ :

$$\begin{array}{ccc}
 b & \delta & c \\
 | & | & | \\
 \hline
 & & b\delta + \delta c = bc.
 \end{array}$$

Gēns  $\delta$  atrodas ārpus posma  $bc$ , gēna  $c$  pusē, ja rekombinācijas biežums starp  $\delta$  un  $b$  ir vienāds ar rekombināciju biežumu summu starp  $c$  un  $\delta$  un starp  $b$  un  $c$ :

$$\begin{array}{ccc}
 b & c & \delta \\
 | & | & | \\
 \hline
 & & b\delta = bc + c\delta.
 \end{array}$$

Gēns  $\delta$  atrodas ārpus posma  $bc$ , gēna  $c$  pusē, ja rekombināciju biežums starp  $\delta$  un  $c$  ir vienāds ar rekombināciju biežuma summu starp  $\delta$  un  $b$  un starp  $b$  un  $c$ :

$$\begin{array}{ccc} \delta & b & c \\ | & | & | \\ \hline & & \end{array} \quad \delta c = \delta b + bc.$$

Piemēram, ir noteikts, ka gēns  $h$  drozofilai atrodas vienā saistības grupā ar  $e$  un  $c$ . Jānosaka to savstarpējais novietojums, vadoties pēc analizējošās krustošanās rezultātiem:

$$\text{♀ } \frac{c+h+e+}{c \ h \ e} \quad \times \quad \text{♂ } \frac{c \ h \ e}{c \ h \ e}$$

Jāatceras, ka drozofilai var analizēt tikai triheterozigotisko mātišu pēcnācējus, jo tēviņiem krustmija nenotiek, tātad  $F_b$  rekombinantu nav. Kādā eksperimentā pavisam iegūti 1002  $F_b$  indivīdi, kuri astoņās fenotipiskās skaldīšanās klasēs sadalās šādi:

$c+h+e+$	298	} nerekombinantie indivīdi, kas saņēmuši no mātes
$c \ h \ e$	292	
$c \ h+e$	102	} rekombinanti $c-h$ un $e-h$
$c+h \ e+$	105	
$c+h+e$	89	} rekombinanti $c-e$ un $e-h$
$c \ h \ e+$	86	
$c \ h+e+$	16	} rekombinanti $c-h$ un $c-e$
$c+h \ e$	14	

Tālāk aprēķina rekombinanto indivīdu skaitu un rekombinācijas biežumu katram gēnu pārim:

- 1) gēniem  $c$  un  $h$ :  
 $102 + 105 + 16 + 14 = 237$   
 $237 : 1002 = 0,2365$  jeb 23,6%
- 2) gēniem  $e$  un  $h$ :  
 $102 + 105 + 89 + 86 = 382$   
 $382 : 1002 = 0,3812$  jeb 38,1%
- 3) gēniem  $c$  un  $e$ :  
 $89 + 86 + 16 + 14 = 205$   
 $205 : 1002 = 0,2046$  jeb 20,5%

Tā kā visvairāk rekombinantu ir starp  $e$  un  $h$ , tad var teikt, ka gēni  $e$  un  $h$  atrodas pētāmā hromosomas iecirkņa galos, bet gēns  $c$  — tā vidū. Gēnu savstarpējā izvietojuma shēma ir šāda:

$$\begin{array}{cccc} e & 20,5 & c & 23,6 & h \\ | & & | & & | \\ \hline & & 38,1 & & \end{array}$$

Redzams, ka aprēķinātais attālums  $e-h$  ir nedaudz mazāks par attālumu  $e-c$  un  $c-h$  summu:

$$\begin{array}{l} 38,1 < 20,5 + 23,6 \\ 38,1 < 44,1 \end{array}$$



Šis neatbilstības pamatā ir apstākļi, ka, aprēķinot attālumu  $e-h$ , netika ņemti vērā divkārsšie rekombinanti

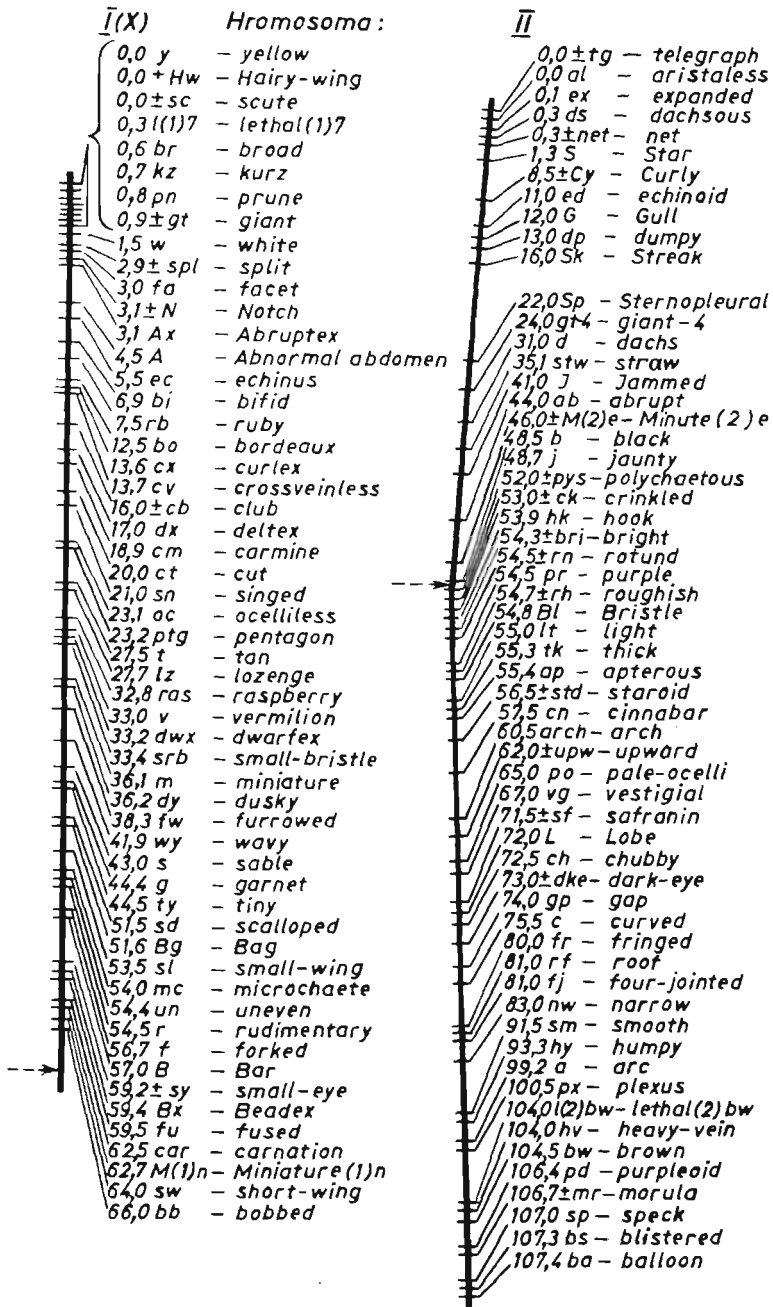
$$\frac{e c h}{e+c+h} \rightarrow \frac{e c+h}{e+c h}$$

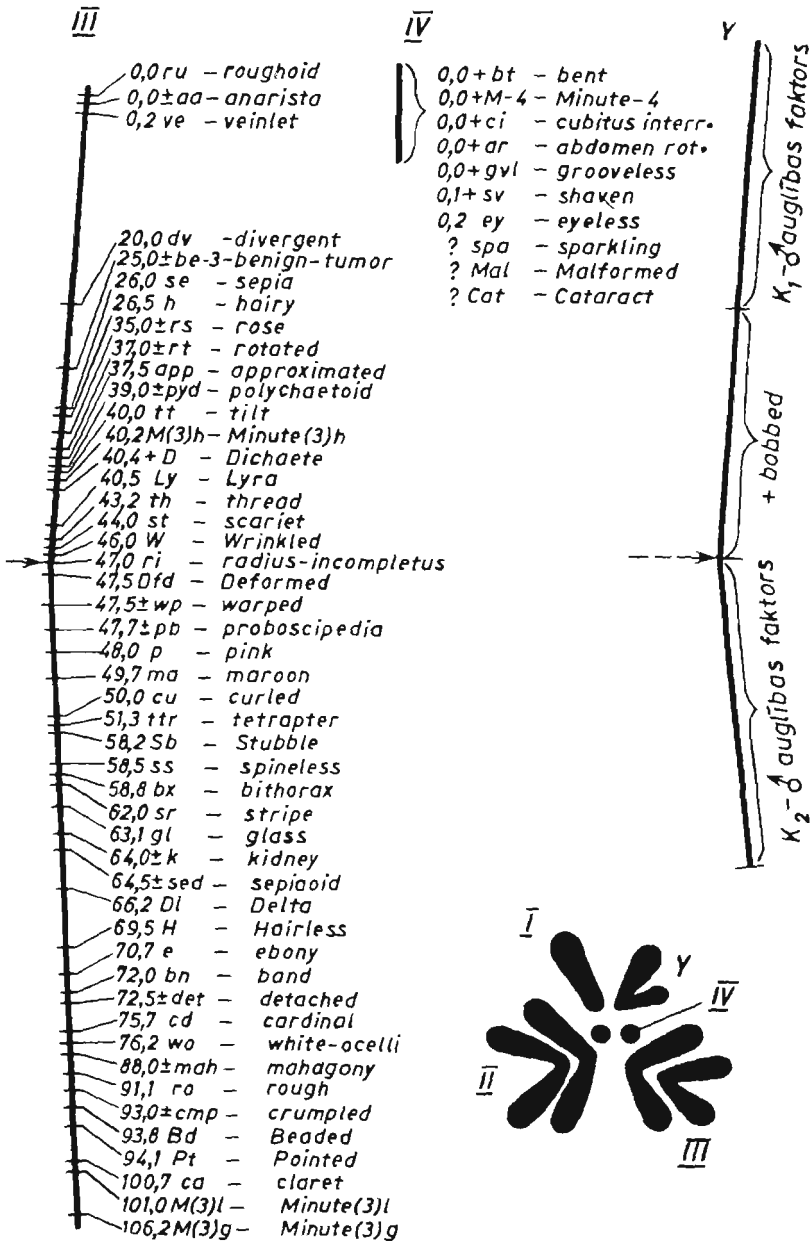
kuri attiecībā uz gēniem  $e$  un  $h$  fenotipiski atgādina nerekombinantus. Tādēļ rekombinantu  $e-h$  skaitam jāpieskaita divkārsšie rekombinantu skaits, pie tam pareizināts ar 2, jo šiem indivīdiem krustmija posmā  $e-h$  ir notikusi divas reizes:  $382 + (16 + 14) \times 2 = 382 + 30 \times 2 = 382 + 60 = 442$ . Tad patiesais rekombināciju biežums posmā  $e-h$  ir  $442 : 1002 = 0,441$  jeb 44,1%. Gēnu savstarpējie attālumi morganīdās ir

$e$	20,5	$c$	23,6	$h$
44,1				

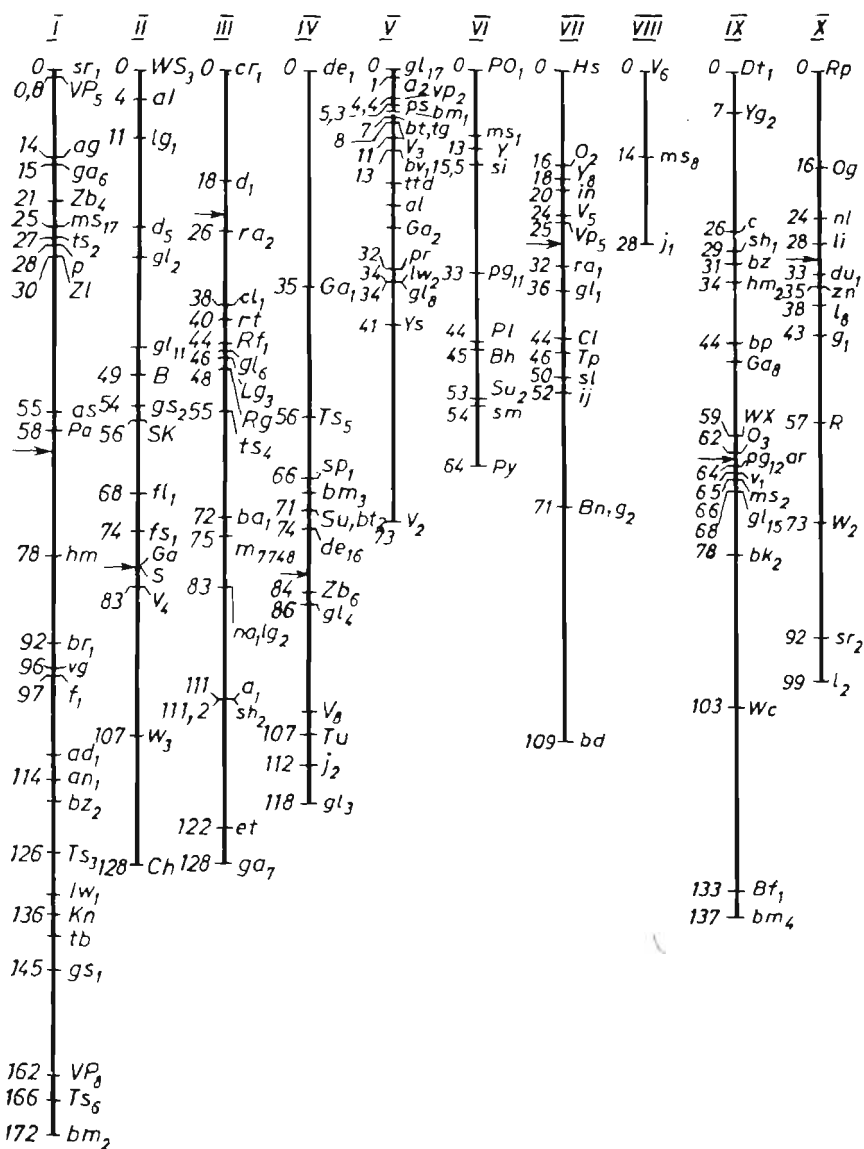
Novērojot tikai divus gēnus —  $e$  un  $h$ , divkārsšo krustmiju nebūtu iespējams atklāt un attālums  $e-h$  tiktu aprēķināts nepareizi. Divkārsšā un vairākkārtīgā krustmija notiek daudz retāk nekā vienkārsšā. Teorētiski divkārsšās krustmijas varbūtība ir vienāda ar abu to sastādošo vienkārsšo krustmiju varbūtību reizinājumu. Krustmiju varbūtību izsaka ar rekombināciju biežumu. Piemēram, ja krustmijas varbūtība posmā  $e-c$  ir 0,205, bet posmā  $c-h$  0,236, divkārsšajai krustmijai posmā  $e-h$  jānotiek ar šādu varbūtību:  $0,205 \times 0,236 = 0,04838$  jeb 4,8%. Faktiski iegūtais divkārsšās rekombinācijas biežums posmā  $e-h$  ir  $(16 + 14) : 1002 = 30 : 1002 = 0,02994$  jeb 3,0%. Tādējādi redzams, ka vienā hromosomas vietā notikusi krustmija traucē krustmiju blakusrajonos. Šo parādību atklāja H. Mellers un nosauca par interferenci. Interferences stiprumu izsaka koincidence. To zināmajam hromosomas rajonam aprēķina, faktisko divkārsšās krustmijas biežumu attiecinot pret teorētiski sagaidāmo gadījumā, ja katra krustmija notiktu neatkarīgi cita no citas:  $0,02994 : 0,04838 = 0,61885$  jeb 62%. Koincidence vērtība var būt dažāda. Ja divi lokusi ir visai attāli vai to starpā ir centromēra, koincidence var būt 100%, t. i., krustmijas viena otru nekavē. Jo tuvāk atrodas lokusi, jo koincidence vērtība samazinās. Attālumu starp gēniem visprecīzāk var aprēķināt, ja tie atrodas tik tuvu viens otram, ka divkārsšā krustmija dotajā posmā vispār nenotiek (koincidence ir 0%). Drozofilai šāds attālums ir 10 morganīdu vai mazāk, bet, ja attālums starp gēniem ir 40 un vairāk morganīdu, koincidence ir 100%, t. i., divas krustmijas viena otru nekavē.

Zinot, kādi gēni veido vienu saistības grupu un cik bieži starp tiem rodas rekombinanti, var sastādīt hromosomas shēmu, kurā parādīts gēnu lineārais izvietojums un to savstarpējais attālums morganīdās. To sauc par hromosomas karti. Hromosomas ģenētiskās kartes sastādīšanai iekreiz krusto indivīdus, kas atšķiras vismaz ar trim saistīto gēnu pāriem, pie tam vēlams, lai saistība būtu pēc iespējas ciešāka (lai nenotiktu divkārsšā krustmija).





4.2. att. Drozofilas hromosomu ģenētiskās kartes. Parādīta tikai neliela ģēnu daļa.



4.3. att. Kukurūzas hromosomu ģenētiskās kartes (parādīta tikai daļa ģēnu). Centromēras atrašanās vietu norāda bultiņa.

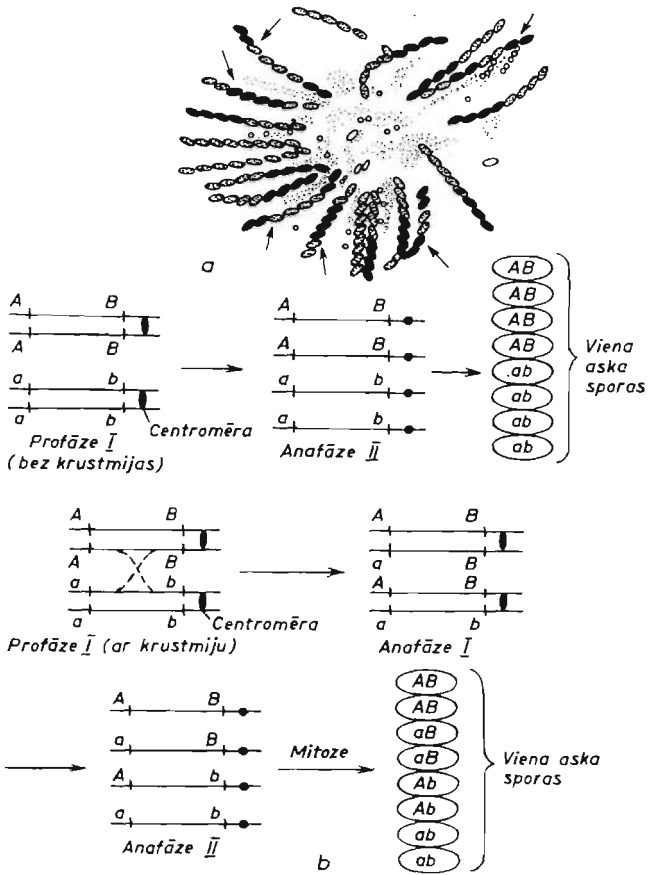
Pirmo ģenētisko karti publicēja A. Stertevant 1913. gadā. Tā bija sastādīta drozofilai. Viņš noteica sešu ģēnu savstarpējo izvietojumu X hromosomā. Eikariotu hromosomas kartēs attēlo kā taisnes, uz kurām mērogā atzīmētas ģēnu atrašanās vietas (lokusi); pie

katra lokusa norādīts tā nosaukums un attālums no vienā hromosomas galā esoša lokusa, kuru pieņem par 0 punktu. Hromosomu karšu sastādīšana ir ļoti darbietilpīga. Eikariotiem pagaidām šis darbs veikts tikai vairākām drozofilu sugām, pelei, cilvēkam, kukurūzai, tomātam, lauvmutītei, zirņiem, rīsiem, miežiem, raugam, neiroporai. Apskatot hromosomu kartes (4.2., 4.3. att.), redzams, ka daudzu karšu garums ir vairāk nekā 100 morganiādas. Šādi skaitļi rodas tādēļ, ka savstarpējos attālumus nosaka cieši saistītiem gēniem, bet kopējo hromosomas garumu aprēķina, summējot šos attālumus.

### 4.3. REKOMBINĀCIJU UZSKAITE HAPLOFĀZĒ

Vairumam eikariotu sugu dzīves ciklā galvenā ir diplofāze, tādēļ par krustmiju, kas tiem notikusi mejozes laikā, var spriest tikai pēc gametu apaugļošanās rezultātā radušās nākošās paaudzes. Tieši novērot krustmijas rezultātus var tikai tādiem organismiem, kam haplofāze ir pietiekoši izteikta, lai to varētu pētīt neatkarīgi no diplofāzes. Piemēram, sarkanās pelējumsēnes *Neurospora crassa* dzīves ciklā valdoša ir haplofāze, bet diplofāzi veido tikai garena zigota, kurā drīz pēc apaugļošanās sākas mejoze. Mejozes rezultātā izveidojas asks — soma ar 8 haploidālām sporām (sākumā veidojas 4 haploidālas šūnas, bet pēc tam katra šūna vēlreiz dalās mitotiski). Katru sporu ar mikromanipulatoru var izņemt no aska un barības vidē no tās izaudzēt haploidālu micēliju. Viens no pelējumsēnes gēniem nosaka sporas nobriešanas ātrumu. Dominantā alēle nosaka ātrāku sporu nobriešanu (to apvalki ir tumši), recesīvā — vēlāku (sporu apvalki ir gaiši). Šā gēna iedzimšanu ir sevišķi ērti novērot, jo nav nepieciešams sporas izsēt. Ja diplofāze ir heterozigotiska pēc šī gēna (*Aa*), tad jau pirmās (reduktīvās) dalīšanās laikā viena no abām meitšūnām saņem alēli *A*, bet otra — *a*. Pēc nākošās dalīšanās radīsies divas šūnas ar genotipu *A* un divas — ar *a*, bet pēc mitozes askā būs četras *A* tipa (tumšas) un četras *a* tipa (gaišas) sporas. Tā kā abu meiotisko dalīšanos vārpstas askogēnajā šūnā (zigotā) novietojas gareniskās ass virzienā, tad visas sporas sakārtotas vienā virknē: *AAAAaaaa*. Askus ar lineāri novietotām sporām sauc par regulārajiem askiem.

Ja rajonā starp lokusu *A* un hromosomas centromēru notiek krustmija, tad askā izveidojas citāds sporu sakārtojums: *AAaaAAAA*, *AAaaaaAA* vai *aaAAAAaa*. Ja kāds cits gēns *B* atrodas starp krustmijas vietu un centromēru, tad gēnā *B* rekombinācijas nenotiek (4.4. att.). Jo lielāks lokusa attālums no centromēras, jo lielāka ir varbūtība, ka šai posmā notiks krustmija. Pelējumsēnes ģenētiskajā hromosomas kartē par 0 punktu pieņem centromēru un gēnu izvietošanu nosaka attiecībā pret centromēru. Attālumu starp gēnu un centromēru aprēķina, rekombinanto asku skaitu attiecinot pret kopējo asku skaitu; to izsaka morganiādās. Tā kā pelējumsēnei katras divas sporas faktiski pārstāv vienu mejozes rezultātā izveidojušos šūnu, tad šo darba metodi var saukt par tetrādu analīzes metodi.



4.4. att. Heterozigotiskas sarkanās pelējumsēnes *Neurospora crassa* askusporu skaldīšanās atkarībā no nogatavošanās ātruma:

a — asku ārējais izskats (tumšās askusporas jau sasniegušas gatavību, gaišās vēl nav nobriedušas; bultiņa norāda askus, kuros notikusi krustmija), b — mejozes norise heterozigotās askā.

Ar tetrādu analīzi var noteikt ne tikai attālumu no gēna līdz centromērai. Šī metode ļauj secināt arī, ka viena mejozes cikla rezultātā notikusi rekombinācija dod reciprosus (savstarpēji pretējos) rekombinanto šūnu tipus vienādā skaitā. Vienā askā nekad arī neiegūst visas astoņas rekombinantās sporas. Tas pierāda, ka krustmija notiek nevis četrū hromatīdu stadijā, bet gan divu hromatīdu stadijā.

Maizes raugam *Saccharomyces cerevisiae* katrā askā ir sporu tetrāde. Šīs sporas nav novietotas lineāri. Tādus askus sauc par neregulāriem. Neregulārajos askos ar tetrādu analīzes palīdzību var noteikt tikai sporu tetrādes skaldīšanās attiecībā 2:2 jeb 1:1, un

krustmiju pēc viena gēna uzskaites nav iespējams konstatēt. Ja novēro divu saistīto gēnu alēļu skaldīšanos, var noteikt rekombinanto sporu parādīšanās biežumu. Piemēram, diheterozigota  $a^+a b^+b$  mezozes rezultātā var veidot triju tipu askus:

$a^+b^+$	$a^+b^+$
$a b$	$a b$

*P* tipa asks

$a^+b^+$	$a b$
$a^+b$	$a b^+$

*N* tipa asks

$a^+b$	$a^+b$
$a b^+$	$a b^+$

*T* tipa asks

*P* tipa jeb vecāku ditipa askā atrodas sporu tetrāde, kurā ir sporas tikai ar abu izejas celmu alēļu kombinācijām ( $a^+b^+$  un  $a b$ ). *T* tipa jeb tetratipa askā atrodas četru tipu sporas — divas ar izejas celmu (vecāku) alēļu kombinācijām ( $a^+b^+$  un  $a b$ ) un divas ar jaunām alēļu kombinācijām ( $a^+b$  un  $a b^+$ ). *N* tipa jeb nevecāku ditipa askos atrodas sporas tikai ar jaunām alēļu kombinācijām ( $a^+b$  un  $a b^+$ ). Ja alēļu pāri  $a$  un  $b$  nav saistīti (atrodas dažādos homologisko hromosomu pāros), tie mejozē pa meišūnām sadalās viens no otra neatkarīgi. Tādā gadījumā *P* un *N* tipa aski veidojas ar vienādu varbūtību, kopā sastādot  $1/3$  no visiem askiem, bet *T* tipa aski sastāda  $2/3$  no asku kopskaita. *P* un *N* tipa sporu tetrādes veidojas tikai hromosomu kombinēšanās rezultātā, bet *T* tipa tetrādes veidojas, kombinējoties tādām hromosomām, kurās starp  $a$  vai  $b$  lokusu un centromēru notikusi krusmija. Ja  $a$  un  $b$  lokusi atrodas vienā hromosomā un ne pārāk tālu viens no otra, tad *P* tipa asku sastopamības varbūtība palielinās, bet samazinās *T* un it īpaši *N* tipa asku sastopamība. Gēnu neatkarīgu iedzimšanu var uzskatīt par pierādītu, ja

$$f_P = f_N, \text{ bet } f_T = 0,667,$$

kur  $f_P$  — *P* tipa asku varbūtība (relatīvā frekvence),  $f_N$  — *N* tipa asku varbūtība,  $f_T$  — *T* tipa asku varbūtība.

Lokusu savstarpējo izvietojumu var pētīt arī, sporas izsējot uz barotnes un nosakot no tām izaugušo klonu pazīmes. Aprēķinot, cik procentu no kopējā klonu skaita veido kloni ar rekombinantām pazīmēm, iegūst attālumu starp lokusiem morganīdās.

#### 4.4. KRUSTMIJAS CITOLOĢISKAIS PIERĀDIJUMS

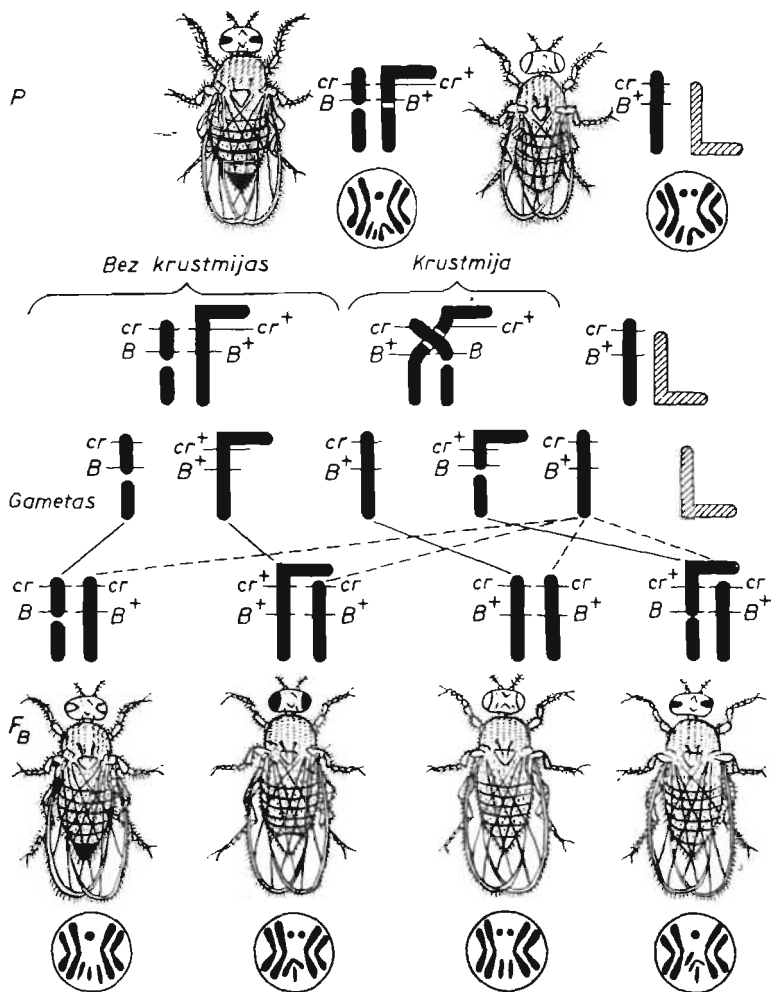
Krustmiju, kuru vispirms atklāja tikai ar hibridoloģiskās analīzes metodēm, 1931. gadā pierādīja arī citoloģiski. Šim nolūkam izmantota objekti, kuriem viena homologisko hromosomu pāra hromosomas nesa ne tikai raksturīgus gēnus — t. s. iezīmētājgēnus, bet bija iezīmētas arī morfoloģiski, līdz ar to tās viegli bija atšķiramas arī mikroskopā. Šādu eksperimentu izdarīja H. Kreitone un B. Maklintonka ar kukurūzu un K. Sterns ar drozofilu.

K. Šternam, apstarojot drozofilas ar rentgenstariem, izdevās iegūt mušu līniju, kurām  $Y$  hromosoma bija zem leņķa piestiprināta vienam  $X$  hromosomas galam, tādējādi šai «apvienotai» hromosomai bija burta  $L$  forma; citai līnijai  $X$  hromosoma bija stipri saīsināta, jo no tās bija atrauts fragments bez centromēras, kurš bija pievienojies 4. hromosomai. Tā kā hromosomu materiāls šo pārkārtojumu rezultātā nebija zaudēts, abām līnijām bija normāla dzīvotspēja. Normāli attīstījās arī dzimum pazīmes, jo, kā zināms, drozofilas dzimums nav atkarīgs no  $Y$  hromosomas klātienas, bet gan no  $X$  hromosomu un autosomu skaita attiecības ( $Y$  hromosoma nepieciešama tikai tēviņu fertilitātei). Krustojot abas līnijas, ieguva mātītes ar divām citoloģiski iezīmētām  $X$  hromosomām. Šīs hromosomas saturēja arī iezīmētājgēnus. Saīsinātajā  $X$  hromosomā bija recesīvais gēns  $cr$  (angļu *carnation* — lielziedu neļķe), kurš nosaka brūnas acis, un dominantais gēns  $B$  (angļu *Bar* — stienītis), kurš nosaka sašaurinātas, svitrveida acis ar samazinātu fasetu skaitu.  $L$  veida hromosoma saturēja šo gēnu savvaļas tipu alēles — dominantu  $cr^+$  (sarkanas acis) un recesīvo  $B^+$  (apaļas acis). Šādas mātītes krustoja ar tēviņiem, kuriem bija morfoloģiski normāla (nūjiņveidīga)  $X$  hromosoma ar abu gēnu recesīvajām alēlēm —  $cr$  un  $B^+$ . Šīs analizējošās krustošanas rezultāti parādīti 4.5. attēlā, pie tam apskatītas tikai mātītes, jo tās no tēva saņēma normālās formas  $X$  hromosomu, ar kuru varēja salīdzināt no mātes saņemto  $X$  hromosomu.

Krustošanā iegūtās apmēram 400 mātītes izveidoja četras klases. Divās no tām, kurām piederēja vairums  $F_2$  mušu, bija abu pazīmju (acu krāsas un formas) sākotnējās kombinācijas — brūnas, šauras acis ( $cr, B$ ) un sarkanas, apaļas acis ( $cr^+B^+$ ). Pārējās divās klasēs bija jaunas pazīmju kombinācijas — brūnas, apaļas acis ( $cr, B^+$ ) un sarkanas, šauras acis ( $cr^+, B$ ). Mikroskopiskie pētījumi pierādīja, ka visām analizētajām mātītēm viena  $X$  hromosoma bija nūjiņveidīga (saņemta no tēva), bet otra  $X$  hromosoma (no mātes saņemta) katrā klasē bija citāda. Mātītēm ar brūnām, šaurām acīm šī  $X$  hromosoma bija saīsināta; mātītēm ar sarkanām, apaļām acīm tā bija  $L$  veidīga; mātītēm ar brūnām, apaļām acīm tā bija normāla (nūjiņveidīga), bet mātītēm ar sarkanām, šaurām acīm  $X$  hromosoma bija gan saīsināta, gan  $L$  veidīga. Tādējādi tiem indivīdiem, kuriem parādījās sākotnējās pazīmju kombinācijas, arī no mātes saņemta  $X$  hromosoma nebija morfoloģiski mainījusies, bet rekombinantajām mušām no mātes bija saņemta jaunas formas  $X$  hromosoma, kura varēja izveidoties tikai tad, ja mātes  $X$  hromosomas apmainītos ar iecirkņiem, t. i., ja notiktu krustmija.

Drozofilai ir zināmas daudzas hromosomu uzbūves pārveides, kad kāds hromosomas rajons ir zaudēts vai arī ir divkāršojies. Politēno hromosomu preparātos šos rajonus var precīzi noteikt, jo politēnās hromosomas konjugē pēc principa «disks pret disku» un diski, kam nav homologu, izveido sānu cilpu (sk. 6.26. att.). Lidz ar hromosomu materiāla zaudējumu vai divkāršošanas mainās arī to pazīmju izpausme, kuru gēni atrodas pārveidotajā iecirknī. Piemēram, heterozigotām  $w^+w$ , kurām jābūt ar sarkanām acīm (dominē





4.5. att. Krustmijas citoloģiskais pierādījums drozofilai. Paskaidrojumi tekstā.

alēle  $\omega^+$ ), fenotipiski var parādīties recesīvā pazīme — baltas acis, jo alēle  $\omega^+$  tiek nozaudēta. Šajā gadījumā pazūd arī viens no X hromosomas diskiem, bet otrajā X hromosomā (ar gēnu  $\omega$ ) pret zaudējuma vietu tas izliecas lokā. Tādā veidā gēnus var saistīt ar konkrētiem politēno hromosomu diskiem, kuri izveido hromosomu citoloģiskās kartes. Ja salīdzina gēnu izvietojumu citoloģiskajās un ģenētiskajās kartēs, izrādās, ka gēnu kārtība tajās pilnīgi sakrīt, taču fiziskie attālumi starp gēniem citoloģiskajā kartē ne vienmēr ir proporcionāli ģenētiskajiem attālumiem, kas aprēķināti, vadoties no

pazīmju rekombinācijas. Galvenais šo atšķirību cēlonis ir nevienmērīgi notiekošā krustmija (sk. 4.6. nod.).

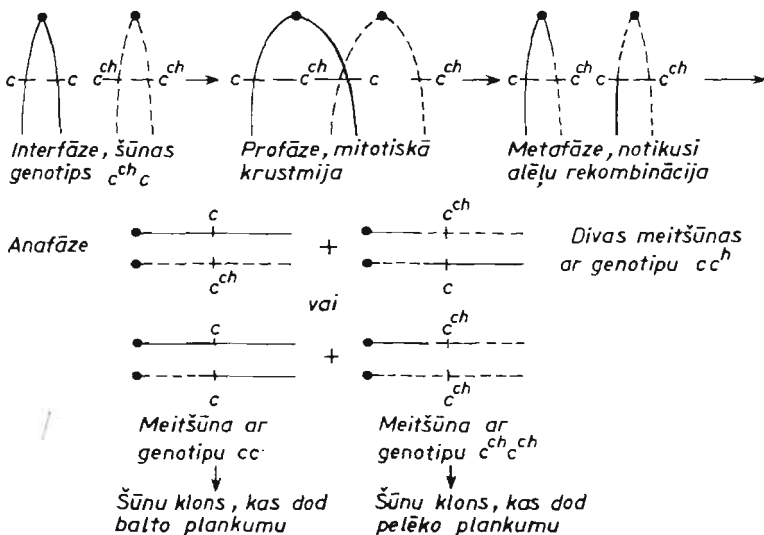
Pamatojoties uz pētījumiem ar drozofilu, galvenokārt par pazīmju saistību ar dzimumu un krustmiju, T. Morgans formulēja hromosomālās iedzimtības teoriju. Tās galvenās tēzes ir šādas.

1. Gēni hromosomās atrodas lineārā secībā, noteiktos attālumos viens no otra.
2. Viena gēna alēles atrodas homologisko hromosomu identiskās vietās (lokusus).
3. Pazīmes, kuru gēni atrodas vienā hromosomā, iedzimst saistīti.
4. Starp homologiskajām hromosomām notiek regulāra apmaiņa ar gēniem — krustmija jeb krosingovers.
5. Krustmijas biežums ir atkarīgs no attāluma starp gēniem.

### 4.5. MITOTISKĀ KRUSTMIJA

Saistīto gēnu rekombinācija var notikt ne tikai mejozē, bet retumis arī šūnu mitotiskās dalīšanās laikā. Tādā gadījumā to sauc par mitotisko krustmiju. Pirmo reizi to aprakstīja A. Serebrovskis 1925. gadā, balstoties uz pētījumiem par vistām. Krustmija var notikt tikai tad, ja homologiskās hromosomas atrodas cieši blakus un ja katra hromosoma jau reduplicējusies — sastāv no divām hromatīdām, kuras kopā satur centromēra.

Ir novērojumi, ka mitozes profāzē homologiskās hromosomas at-



4.6. att. Peles 1. hromosomas lokusā  $c$  notiekušās mitotiskās krustmijas shēma.

rodas daudz tuvāk viena otrai nekā nehomoloģiskās un šķiet, ka interfāzē tas izteikts vēl krāsāk. Interfāzes beigās hromosomas jau ir reduplicējušās, katra sastāv no divām hromatīdām. Parasti abas māshromatīdas ir savstarpēji identiskas, taču, ja ir notikusi krustmija un organisms ir heterozigotisks, alēļu sastāvs tajās var pārmainīties (4.6. att.). Ir iespējams, ka vienā meitšūnā nokļūst abas hromatīdas ar dominanto alēli (vienu rekombinanta, otra — nemainījusies), bet otrā — abas ar recesīvo alēli. Katra šā notikuma varbūtība ir 50%. Ja krustmija notikusi embrionālās attīstības laikā, no homozigotiskās šūnas var savairoties klons, kas fenotipiski atšķiras no pārējām (heterozigotiskajām) organisma šūnām. Piemēram, pelei I. hromosomu pāri ir albinisma gēns *c* ar multiplo alēļu sēriju, kas nosaka dažādu apmatojuma pigmentācijas samazināšanos. Homozigota *cc* ir albinoss, homozigota *c<sup>ch</sup>c<sup>ch</sup>* — ar gaišu matu pamatdaļu (t. s. šinšilla), bet heterozigota *c<sup>ch</sup>c* ir ar gaišu matu pamatdaļu un ar pavājinātu matu galu krāsojumu (t. s. gaišā šinšilla) (4.7. att.). Ja lokusā *c* heterozigotai notiek mitotiskā krustmija, uz vienlaidus apmatojuma rodas divi simetriski plankumi — balts un tumšs. Mitotiskā krustmija dod pazīmju rekombināciju tikai tad, ja notiek posmā starp hromosomas centromēru un pazīmi kodējošu lokusu. Ja alēļu pāri dominēšana ir pilnīga, fenotipiski var reģistrēt tikai šūnu klonu ar recesīvo alēli homozigotiskā stāvoklī.



4.7. att. Peles I. hromosomas lokusā *c* notikušās krustmijas fenotipiskā izpausme — kontrastejoši simetriski plankumi heterozigotas *c<sup>ch</sup>c* apmatojumā. Balto plankumu veido šūnu klons ar genotipu *cc*, tumšo — ar genotipu *c<sup>ch</sup>c<sup>ch</sup>*.

#### 4.6. FAKTORI, KAS IETEKMĒ KRUSTMIJU

Krustmiju, kā jebkuru šūnas procesu, ietekmē daudzi faktori. Starp tiem ir tādi, kas palielina krustmijas biežumu (rekombinogēni), un tādi, kas to samazina (antirekombinogēni). Rekombināciju biežumu var mainīt dažādos līmeņos — iekššūnas, šūnas, organisma un populācijas līmenī. Faktoriem, kas darbojas populācijas, organisma vai šūnas līmenī, parasti ir vispārēja, nespecifiska iedarbība

uz rekombinācijām. Pie tiem pieder sekojoši bioloģiskas dabas faktori:

a) indivīda dzimums — heterogametiskajam dzimumam krustmija vai nu nenotiek (drozofilu tēviņiem, tauriņu mātītēm), vai arī notiek retāk nekā homogametiskajam dzimumam (peļu tēviņiem, baložu mātītēm);

b) indivīda vecums dažādi ietekmē krustmijas biežumu, piemēram, drozofilām, pelēm;

c) genoma struktūra — homologisko hromosomu struktūras atšķirības samazina krustmiju attiecīgajos iecirkņos (sk. arī 6.3.3. un 6.3.4. nod.), heterohromatīna sakopojumi palielina krustmiju citās hromosomās, bet apspiež to blakusrajonos, papildhromosomas maina krustmijas biežumu augiem;

d) organisma funkcionālais stāvoklis — heteroze palielina krustmijas biežumu, tāpat arī hibrīdiem tā ir biežāka, ir pozitīva sakarība starp organisma jutību pret temperatūru, apstarošanu un starp rekombināciju biežumu, tāpat heterohromatīna rajonos krustmijas biežums vairāk variē nekā eihromatīna rajonos.

Daudziem faktoriem ir specifiska ietekme. Tie ir īpaši genotipa gēni, kuru mutantās alēles iedarbojas dažādā veidā:

a) izjauc hromosomu normālo konjugāciju;

b) apspiež pašu krustmiju;

c) traucē hiasmu veidošanos;

d) traucē hromosomu pareizu attālināšanos anafāzē;

e) izraisa hromosomu salipšanu.

Uzkrājas arvien vairāk pierādījumu, ka krustmiju kontrolē daudzi gēni un arī citoplazmatiskie faktori. Nebioloģiskas dabas faktori, kas ietekmē rekombināciju biežumu, var būt fizikāli vai ķīmiski. Fizikālie faktori ar nespecifisku iedarbību ir temperatūra (pārmaina fermentu sistēmu aktivitāti) un dažādu veidu jonizējošais starojums (saraujot polinukleotīdu ķēdes, pārmaina hromosomu struktūru). Ultravioletajam starojumam ir specifisks efekts — tas ierosina timīna (mazākā mērā — arī uracila un citozīna) dimēru veidošanos, un rezultātā mainās DNS struktūra. Bez tam ultravioletie stari izraisa DNS bāzu oksidēšanos, hidratāciju, sarauj kovalentās un ūdeņraža saites, rezultātā tiek pārtraukta nukleīnskābju biosintēze. Ultravioletais starojums var iedarboties tikai uz viensūnas organismiem vai uz atsevišķām šūnām. Rekombinogēna iedarbība ir arī gravitācijas laukum,  $\gamma$  stariem un ultraīviļņu diapazonu elektromagnētiskajiem viļņiem. Ķīmisko faktoru vairumam ir daudzpusīga iedarbība uz šūnas struktūrām. Daudzi aktīvākie rekombinogēni iedarbojas uz DNS vai kavē DNS sintēzi un pārveido hromosomu struktūru vai izraisa gēnu mutāciju. Daudzi rekombinogēni ir antibiotiskas vielas, kas apspiež DNS, RNS un proteīnu sintēzi. Piemēram, antibiotika mitomicīns C, kas piešķaitāms alkilējošiem savienojumiem, inhibē galvenokārt DNS sintēzi, veido kovalentās saites starp komplementārām DNS ķēdēm, paildzinot interfāzes S un G<sub>2</sub> periodu, tāpat var saistīt arī dažādas DNS molekulas, izraisot hromosomu somatisko konjugāciju. Cita

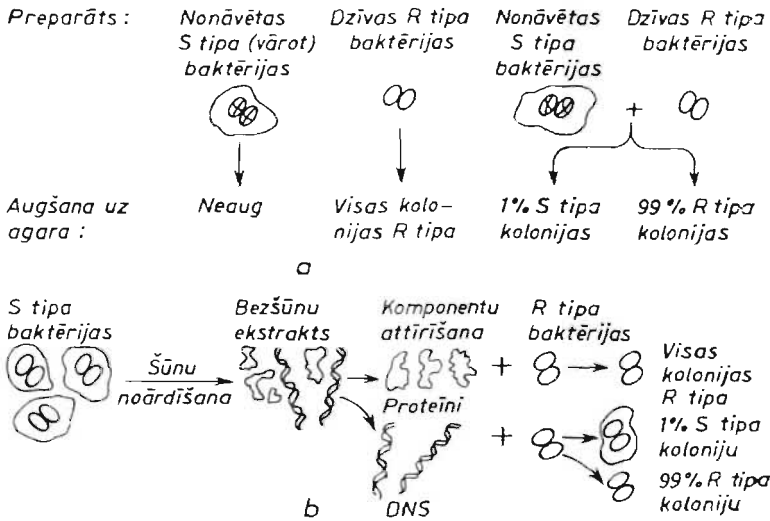
antibiotika — aktinomicīns D apspiež RNS un proteīnu sintēzi, apstādina šūnu dalīšanos interfāzes G<sub>1</sub> un S periodā. Rekombinogēni ir vairāki slāpekļa bāzu analogi: uracila analogs 5-fluoruracils, adenīna analogs 3-dezoksiadenozīns un citi, kas inhibē DNS sintēzi. Ir vielu grupa, kuras ietekmē šūnas enerģijas maiņu un tādā veidā arī ģenētisko rekombināciju biežumu. Piemēram, fosforilēšanu inhibē kofeīns un 2,4-dinitrofenols, kas arī ir rekombinogēni.

## 4.7. REKOMBINĀCIJA PROKARIOTOS

Prokarioti vairojas bezdzimumiski. Tomēr arī starp prokariotiem notiek ģenētiskā materiāla apmaiņa transformācijas, transdukcijas un konjugācijas ceļā.

### 4.7.1. TRANSFORMĀCIJA

Jau 1928. gadā F. Grifits novēroja, ka, kopā audzējot nonāvētas patogēnu pneimokoku šūnas ar dzīvām nepatogēnu pneimokoku šūnām, pēdējās kļūst patogēnas un izraisa pelu saslimšanu. Uz agara barotnes patogēnais celms (ar kapsulām) veido gludas, S tipa kolonijas (angļu *smooth* — gluds), nepatogēnais celms (bez kapsulām) veido graudainas, R tipa kolonijas (angļu *rough* — rievains). Izsējot nonāvētu S tipa un dzīvu R tipa pneimokoku maisījumu, apmēram 1% koloniju ir S tipa, gludas. Šo parādību nosauca par transformāciju, un tās pamatā acīmredzot ir iedzimto pazīmju



4.8. att. Ģenētiskā transformācija:

a — transformācija ar nonāvētām S tipa šūnām, b — transformācija ar pneimokoku S tipa šūnu DNS.

pārņemšana (4.8. att. a). Transformējošā faktora ķīmisko dabu pētīja O. Eiverijs ar līdzstrādniekiem. Viņi 1944. gadā pirmo reizi pierādīja, ka transformējošais faktors ir DNS (4.8. att. b), bet ne proteīni, kā domāja agrāk. Dabā transformācija ir konstatēta *Streptococcus*, *Bacillus*, *Haemophilus*, *Neisseria* un *Rhizobium* ģints baktērijām, kā arī daudzām aktinomicētēm.

Transformācija ir daudzpakāpju process. Sākumā DNS dubultspirāle saistās pie kompetentas baktērijas šūnas sienas. Uz šādu šūnu virsmas atrodas īpašs kompetences faktors, kura veidošanās ir atkarīga no vides un baktērijas fizioloģiskā stāvokļa. Pēc tam DNS dubultspirāle caur šūnas sienu un plazmas membrānu nonāk citoplazmā. Šajā laikā baktērijas periplazmā DNS fragmentē endonukleāzes un viens no DNS paveidiem tiek noārdīts, domājams, ar eksonukleāzēm. Abi pirmie transformācijas etapi ir nespecifiski un notiek ar jebkuru divpavedienu DNS. Trešajā etapā baktērijas citoplazmā iekļuvusi vienpavediena DNS saistās ar šūnas rekombinācijas sistēmas proteīniem, kurus kodē *rec* gēni. Seko rekombinācija starp transformētās DNS un šūnas genomiskās DNS homoloģiskām nukleotīdu secībām. Transformācijā uz šūnu recipientu var pārnest līdz  $1/200$  no baktērijas donora hromosomas. Transformācijas efektivitāte, aprēķinot pret šūnu recipientu, pneimokokiem ir  $10^{-2}$ — $10^{-3}$ , bet hemofilajām baktērijām —  $10^{-3}$ — $10^{-7}$ .

Transformāciju var izmantot gēnu secības un to relatīvo attālumu noteikšanai. Tuvāk novietotie gēni biežāk nekā attālinātie transformējas vienlaicīgi (kottransformējas). Vienlaicīgas transformācijas biežums ir proporcionāls attālumam starp analizējamiem gēniem. Piemēram, recipientu, kas satur 2 mutantas alēles *a* un *c* un vienu normālu alēli *b*<sup>+</sup>, transformē ar DNS, kas satur 2 normālas alēles *a*<sup>+</sup> un *c*<sup>+</sup> un vienu mutantu alēli *b*. Analizē 100 transformantus, kurus atlasa pēc iezīmētā gēna *a*<sup>+</sup>. Iegūst 6 *a*<sup>+</sup>*b* un 50 *a*<sup>+</sup>*c* klonus. Tātad iezīmētā gēna *a*<sup>+</sup> un *b* kotransformācijas biežums ir 6%, bet *a*<sup>+</sup> un *c*<sup>+</sup> — 50%. No tā var secināt, ka *c*<sup>+</sup> ir tuvāk *a*<sup>+</sup> nekā *b*<sup>+</sup>. Pēc tam izdara transformantu atlasī pēc cita selekcionējama iezīmētā gēna, piemēram, *c*<sup>+</sup>. Iegūst 10 *c*<sup>+</sup>*b* un 40 *c*<sup>+</sup>*a*<sup>+</sup> klonus. Tātad *c*<sup>+</sup> un *b* kotransformācijas biežums ir 10%, bet *c*<sup>+</sup> un *a*<sup>+</sup> — 40%, un *c*<sup>+</sup> ir tuvāk *a*<sup>+</sup> nekā *b*. Salīdzinot abos eksperimentos iegūtos rezultātus, var secināt, ka gēnu secība ir *a*—*c*—*b* un attālums starp *a* un *c* ir mazāks nekā starp *c* un *b*.

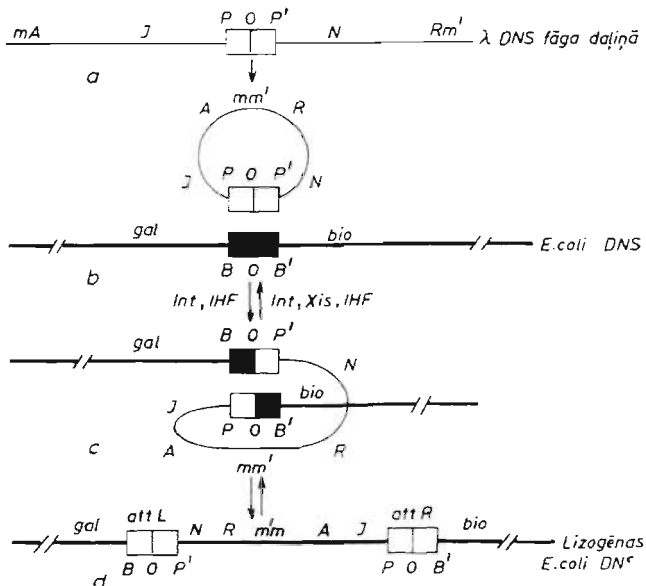
#### 4.7.2. TRANSDUKCIJA

1951. gadā N. Cinders un Dž. Lederbergs, pētot salmonellu bakteriofāga P22 replikāciju, atklāja, ka fāga morfoģenēzes laikā DNS iepakojšana kapsidā ne vienmēr ir specifiska. Fāga populācijā ar biežumu  $10^{-4}$ — $10^{-5}$  atrada daļiņas, kas vai nu kopā ar fāga DNS satur arī baktērijas hromosomas fragmentu, vai arī satur tikai daļu no baktērijas hromosomas. Šādi fāgi ir defektīvi. Tie var inficēt baktēriju un ievadīt tajā DNS. Bet fāga replikācija nenotiek, jo ir zaudēta daļa no fāga lineārās divpavediena DNS genoma. Starp bak-

tērijas DNS, kas šūnā iekļuvusi kopā ar fāgu, un šūnas hromosomu var notikt homologiska rekombinācija. Baktērijas ģenētiskā materiāla pārvešanu ar bakteriofāgiem sauc par transdukciju un šādus bakteriofāgus — par transducējošiem bakteriofāgiem. DNS daudzums, ko no donora uz recipientu var maksimāli pārnest, atbilst fāga ģenoma lielumam. Bakteriofāgam P22 tas ir apmēram 90 000 bp, tāpat apmēram 100 baktērijas gēni. Transducēties var jebkurš no baktērijas gēniem. Šādu transdukciju sauc par vispārīgo transdukciju.

Vēlāk transducējošus fāgus atrada arī citām baktērijām, piemēram, *E. coli* atrada bakteriofāgu P1, *Bacillus subtilis* — PSB1 un SP10.

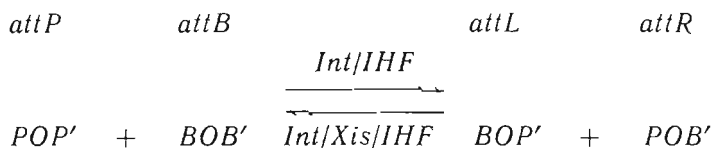
Vispārīgo transdukciju izmanto kā vienu no precīzākajām gēnu ģenētiskās kartēšanas metodēm. Gēnu kartēšanai, tāpat kā transformācijas gadījumā, visbiežāk izmanto pazīmju vienlaicīgo transdukciju (kotransdukciju), t. i., nosaka, ar kādu biežumu bakteriofāgs vienlaicīgi pārnes divu iezīmētājgēnu pārus. Piemēram, ja kotransducējas iezīmētājgēni  $a^+$  un  $b^+$ , un  $b^+$  un  $c^+$ , bet ne  $a^+$  un  $c^+$ , gēnu secība ir  $a-b-c$ . Vienlaicīgas transdukcijas biežuma  $c$  sakarību ar attālumu starp atsevišķiem gēniem minūtēs  $d$  var izteikt vienādojumā  $c = (1-d/L)^3$ , kur  $L$  ir transducētā DNS fragmenta garums minūtēs.



4.9. att. Saitspecifiska rekombinācija starp bakteriofāga  $\lambda$  un *E. coli* ģenomu:

a — bakteriofāga  $\lambda$  lineārās hromosomas ciklizēšana ( $m$  un  $m'$  — ģenoma gali,  $A$ ,  $J$ ,  $N$ ,  $R$  — fāga gēni). b — *E. coli* ģenoma fragments ar  $attB$  saiti. c, d — *E. coli* hromosomā intergrēts  $\lambda$  profāgs.

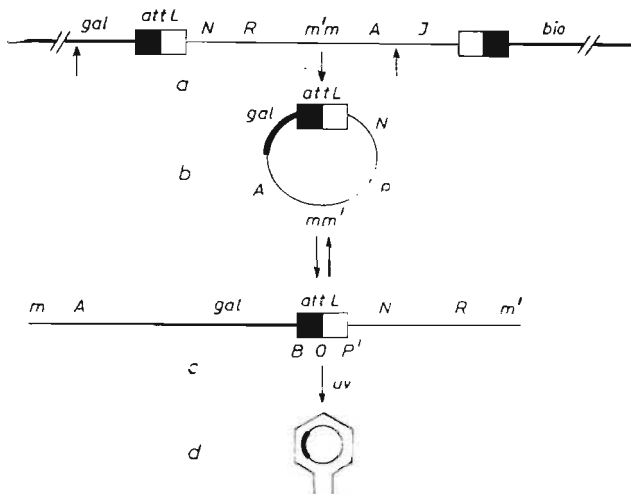
1956. gadā Dž. un E. Lederbergi atklāja otru, ierobežotās jeb specializētās transdukcijas veidu. To novēro ar mēreno bakteriofāgu lizogenizētās baktērijās. Tās satur baktērijas hromosomā integrētu fāga genomu. Integrācija ir specifiska un notiek noteiktā fāga un baktērijas genoma iecirknī, ko sauc par piestiprināšanās jeb *att* saiti (angļu *attachment* — piestiprināšanās). Piestiprināšanas vietu fāga DNS apzīmē ar *attP*, bet atbilstošo vietu baktērijas genomā — ar *attB*. Bakteriofāga  $\lambda$  *attB* vieta *E. coli* hromosomā atrodas starp galaktozes (*gal*) un biotina (*bio*) operonu. Abu piestiprināšanās vietu vidū ir iecirknis *O*, kurā notiek rekombinācija starp fāga un baktērijas genomu. Nukleotīdus pa kreisi no *O* iecirkņa fāga genomā apzīmē ar *P*, bet pa labi no tā — ar *P'*, respektīvi, *attP* vietas struktūra ir *POP'* (4.9. att. a). Baktērijas *attB* vietas struktūra atbilstoši ir *BOB'* (4.9. att. b). Rekombināciju starp *attP* un *attB* vietu katalizē fāga gēna *int* kodētais proteīns — integrāze, piedaloties šūnas faktoram *IHF* (angļu *integration host factor* — integrācijas saimnieka faktors). Vispirms vairākas integrāzes molekulas specifiski saistās ar *attP* vietu fāga hromosomā un veido kondensētu ribonukleoproteīna kompleksu, ko sauc par *intasomu*. Dažas integrāzes molekulas saistās ar *attB* vietu un kompleksējas ar *intasomu*. Pēc tam integrāze šķēļ baktērijas un fāga DNS *O* iecirkņu abos pavadienos un sasaista fāga un baktērijas DNS galus, veidojot profāga galos hibridas *att* vietas — kreisajā pusē *BOP'* (*E. coli* tas atrodas pie *gal* operona) un labajā pusē *POB'* (atrodas pie *bio* operona) (4.9. att. c, d). Kreisā hibrīdo *att* vietu apzīmē ar *attL* (angļu *left* — kreisais), bet labo — ar *attR* (angļu *right* — labais).



Rekombinācija notiek noteiktā nukleotīdu secībā jeb saitā, tāpēc to sauc par saitspecifisko rekombināciju. Tā principiāli atšķiras no vispārīgās rekombinācijas ar to, ka nav nepieciešama izteikta nukleotīdu secības homologija starp baktērijas un fāga genomu *att* saitēm.

Saitspecifiskā rekombinācija ir apgriezeniska, un noteiktos apstākļos profāgs var izšķēties saitspecifiskā rekombinācijā starp *attL* un *attR* vietu. Profāga izgriešanai vajadzīgi divi fāga kodētie proteīni *Int* un *Xis* un baktērijas *IHF*. Tomēr dažos gadījumos — ar biežumu  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  profāga izšķelšana ir neprecīza (4.10. att. a, b) un saitspecifiskā rekombinācijā piedalās nukleotīdi, kas attālināti no integrācijas saitēm *attL* un *attR*. Rezultātā fāga DNS rekombinējas ar daļu no blakusesošās baktērijas hromosomas, zaudējot ekvivalentu daudzumu fāga DNS, kas paliek saistīta ar baktērijas hromosomu. Inducējot ar fāgu  $\lambda$  lizogenizētu *E. coli*, rekombinantais





4.10. att. Transducējoša bakteriofāga  $\lambda$  veidošanās shēma: a — *E. coli* hromosomā integrēts profāgs  $\lambda$ , b — profāgs  $\lambda$  nehomoloģiska izgriešana starp *gal* iecirkni baktērijas hromosomā un starp profāga *A* un *J* gēnu (izgrieztā fāga DNS zaudē iecirkni ar gēnu *J* un iegūst baktērijas hromosomas iecirkni *gal*<sup>+</sup>), c — transducējošā fāga  $\lambda$  defektīvs (d) genoms, d — transducējošā fāga inducēšana ar ultravioleto starojumu.

fāgs saturēs vai nu *gal*, vai *bio* operonu iezīmētājgēnus (4.10. att. c). Pēc iepakojanas prokapsidā rekombinantais fāgs (4.10. att. d) var pārnest šos iezīmētājgēnus uz citu baktēriju, respektīvi transducēt tos baktērijas gēnus, starp kuriem integrējies profāgs.

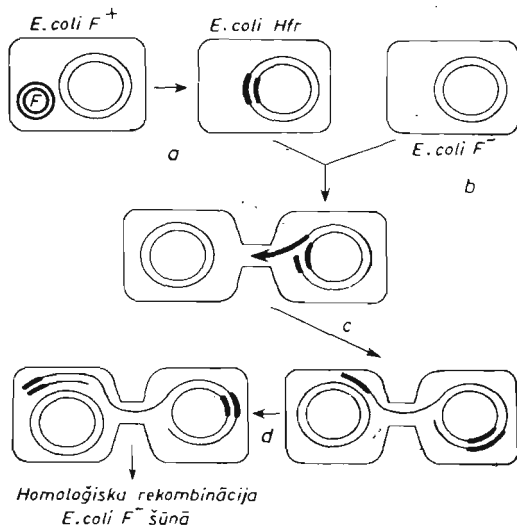
#### 4.7.3. KONJUGĀCIJA

1946. gadā Dž. Lederbergs un E. Teitems novēroja, ka, kopā kultivējot divus auktotrofos *E. coli* celmus, *E. coli* 58—161 (*met*<sup>-</sup>*bio*<sup>-</sup>) un *E. coli* W677 (*thr*<sup>-</sup>, *leu*<sup>-</sup>), ar biežumu 10<sup>-5</sup>—10<sup>-6</sup> veidojas prototrofas, tātad *met*<sup>+</sup>, *bio*<sup>+</sup>, *thr*<sup>+</sup>, *leu*<sup>+</sup> baktērijas. Šo fenomenu nevar izskaidrot ar mutantu varbūtējo spontāno reversiju, jo tās varbūtība, ja spontāno mutāciju vidējais biežums 10<sup>-6</sup>, diviem iezīmētājgēniem ir tikai 10<sup>-6</sup> × 10<sup>-6</sup> = 10<sup>-12</sup>. Acimredzot starp abiem *E. coli* celmiem ir notikusi ģenētiskā materiāla apmaiņa. Tālākie pētījumi rādīja, ka gēnu apmaiņa notiek tikai tad, ja baktērijas kontaktē viena ar otru. DNS pārnēs tikai vienā virzienā, aplūkotajā piemērā no *E. coli* 58—161 uz *E. coli* W677. Tāpēc pirmo nosauca par donora jeb «vīrišķo» šūnu, bet otro — par recipiento jeb «sievīšķo» šūnu. Novēroto parādību nosauca par konjugāciju.

Pētot «vīrišķo» un «sievīšķo» baktēriju atšķirību, atrada, ka donora īpašības ir saistāmas ar fertilitātes (F) faktora klātbūtni «vīrišķajā» baktērijā. 1952. gadā V. Heiss parādīja, ka F—faktors ir



frekvence), jo šāda baktērija kļūst ne tikai par F plazmīdas, bet arī baktērijas hromosomas donoru recipientajai F<sup>-</sup> šūnai. Pēc tam kad izveidojies kontakts starp Hfr un F<sup>-</sup> baktēriju, aktivējas daļa no *tra* operona gēniem, kuri donora šūnā inducē vienu DNS replikācijas ciklu. DNS replikācija sākas no integrētās plazmīdas *oriT* iecirkņa, kas lokalizēts *tra* operonā (4.13. att. b). DNS pārņemšana uz recipientu šūnu notiek vienlaicīgi ar tās replikāciju. Recipientā F<sup>-</sup> šūnā, sākot ar jaunsintezētā DNS pavediena 5' galu, vispirms pārnes to F plazmīdas daļu, kas nesatur *tra* operonu, bet pēc tam ar plazmīdu saistīto baktērijas DNS (4.13. att. c). Tikai



4.13. att. Baktēriju konjugācija:

a — *E. coli* Hfr<sup>+</sup> veidošanās, b — *E. coli* Hfr un *E. coli* F<sup>-</sup> konjugācija, c — pārnestais DNS pavediens var rekombinēties ar recipientās šūnas homoloģiskiem gēniem, d — pārnestais DNS pavediens var kalpot kā matrica DNS reparatīvajai sintēzei; recipientā šūna kļūst daļēji diploīdāla.

replikācijas cikla nobeigumā pārnes arī *tra* operonu. Recipientā šūna, kas saņēmusi visu Hfr hromosomu, pārvēršas par Hfr donoru. Pārņemšanas ilgums ir apmēram 100 minūtes. Reāli Hfr hromosomu uz recipienta šūnu pārnes ļoti reti, jo gandrīz vienmēr konjugācijas laikā šūnu kontakts zūd un recipientā šūna saņem tikai daļu no F plazmīdas un baktērijas genomiskās DNS. Tāpēc rekombinanti, kas iegūti, konjugējot Hfr × F<sup>-</sup>, parasti ir ar F<sup>-</sup> fenotipu. Konjugāciju var pārtraukt arī mākslīgi, baktērijas kultūru intensīvi sakrātot vai homogenizējot.

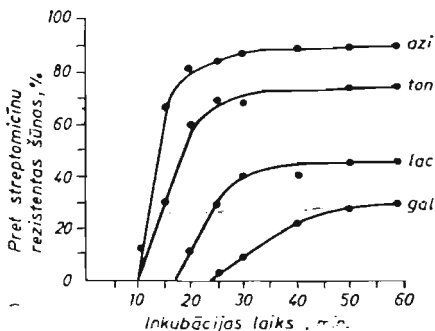
Kā jau minēts, F plazmīda baktērijas hromosomā var būt integrēta dažādos lokusus un dažādi orientēta. Tāpēc baktērijas gēni, kurus recipientā F<sup>-</sup> šūnā ievada pirmos, dažādos Hfr celmos ir atšķirīgi. Nemainās gēnu izvietojuma secība. Starp pārnesto *E. coli* hromosomas daļu un baktērijas recipienta hromosomu *rec* sistēmas proteīnu klātbūtnē notiek homoloģiska rekombinācija. **Bakteriālās hromosomas kartēšanai** izmanto konjugāciju starp Hfr donoriem un F<sup>-</sup> recipientiem. Piemēram, *azi*, *ton*, *lac* un *gal* kartēšanai izmantoja donora *E. coli* HfrH (*thr*<sup>+</sup>, *leu*<sup>+</sup>, *gal*<sup>+</sup>, *lac*<sup>+</sup>, *ton*<sup>r</sup>, *azi*<sup>r</sup>, *str*<sup>s</sup>) celma konjugēšanu ar *E. coli* F<sup>-</sup> (*thr*<sup>-</sup>, *leu*<sup>-</sup>, *gal*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, *ton*<sup>s</sup>, *azi*<sup>s</sup>, *str*<sup>r</sup>) celmu. Pazīmju saīsinājumi paskaidroti 4.1. tabulā.

Tūlīt pēc abu celmu baktēriju kultūru samaisīšanas sākas konjugācija. Regulāri, ik pēc dažām minūtēm, ņem kultūras paraugus un konjugāciju pārtrauc. Pēc tam kultūru izsēj uz cietas selektīvas

*E. coli* hromosomas kartēšanai  
izmantotie iezīmētāģēni

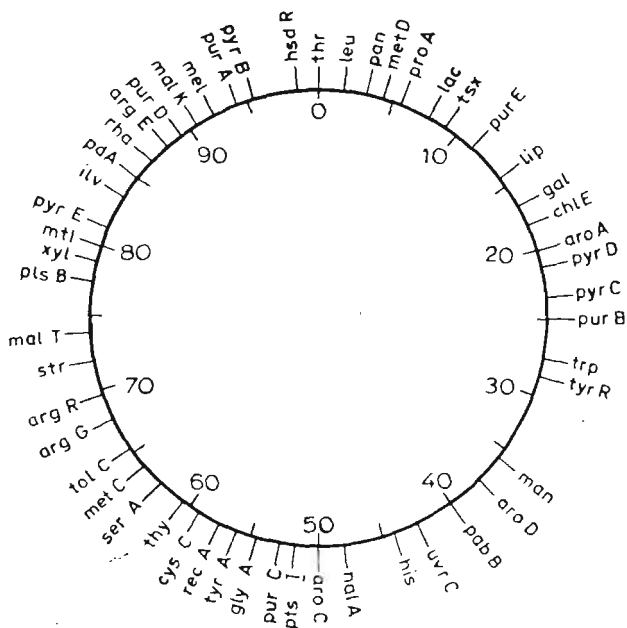
Apzīmējums	Fenotips
<i>thr</i> <sup>-</sup> , <i>leu</i> <sup>-</sup> <i>gal</i> <sup>-</sup> , <i>lac</i> <sup>-</sup> <i>ton</i> <sup>r</sup> , <i>ton</i> <sup>s</sup>	Nesintezē treonīnu, leicīnu Neizmanto galaktozi, laktozi Rezistence, jutība pret infekciju ar bakteriofāgu T1
<i>azi</i> <sup>r</sup> , <i>azi</i> <sup>s</sup> <i>str</i> <sup>r</sup> , <i>str</i> <sup>s</sup>	Rezistence, jutība pret azīdu Rezistence, jutība pret streptomcīnu

barotnes. Aplūkotajā eksperimentā tā saturēja streptomcīnu. Streptomcīna klātbūtnē neaug pret streptomcīnu jutīgās donoršūnas. Barotne nesaturēja arī treonīnu un leicīnu, jo jau iepriekš bija zināms, ka *E. coli* *HfrH* konjugācijas pirmajās minūtēs pārnes *leu* un *thr* iezīmētāģēnus. Savāktajos paraugos regulāri nosaka, kādā laika secībā augošajās recipientsūnās parādās pārējie analizējamie iezīmētāģēnu produkti (4.14. att.). Dotajā eksperimentā pēc 9 min parādījās rekombinants, kas bija izturīgs pret azīdu, pēc 10 min atlasīja pirmos pret infekciju ar bakteriofāgu T1 izturīgos rekombinantus utt. Ja eksperimentu turpina 60 min, tad šajā laikā 90% rekombinantu ir *azi*<sup>r</sup> un 70% rekombinantu — *ton*<sup>r</sup>. Iezīmētāģēnus *lac* un *gal* pārnes vēlāk, tāpēc eksperimenta beigās *lac*<sup>+</sup> rekombinantu ir 40%, bet *gal*<sup>+</sup> rekombinantu — 30%. Rezultātu interpretācija ir vienozīmīga — iezīmētāģēni *leu* un *thr* (zīmējumā nav parādīti) atrodas vistuvāk integrētajai F plazmīdai. Tiem seko *azi*, *ton*, *lac* un *gal*. Jo tālāk no F plazmīdas integrācijas vietas atrodas iezīmētāģēns, jo mazāks eksperimenta beigās ir tā rekombinantu skaits. Tādējādi, izmantojot pārtraukto konjugāciju, var noteikt ģēnu secību un to relatīvo attālumu minūtēs. Pilna baktērijas genoma kartē-



4.14. att. *E. coli* ģēnu kartēšana ar pārtrauktās konjugācijas metodi.

šanai jāizmanto pēc iespējas vairāk iezīmētāģēnu un *Hfr* celmu, kas atšķiras ar integrētās plazmīdas vietām, jo, pieaugot iezīmētāģēna attālumam no *oriT*, rekombinantu skaits samazinās. Samazinās arī iezīmētāģēnu produktu noteikšanas precizitāte. Pilna *E. coli* ģēnu karte aizņem 100 minūtes. Tajā ir lokalizēti vairāk nekā tūkstošis ģēnu lokusu (4.15. att.), kas pārstāv apmēram 30% no *E. coli* ģenētiskās ietilpības. Karte ir cikliska, kas saskan ar elektronmikroskopis-



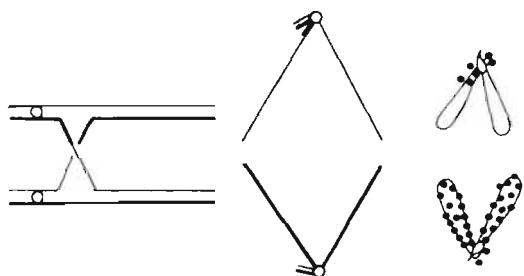
4.15. att. Daļēja *E. coli* ģenētiskā karte.

kiem novērojumiem un fizikāli ķīmiskajos mērījumos iegūtajiem secinājumiem. *E. coli* K12 ģenētiskajās kartēs gēni, kuru funkcija ir radniecīga, parasti ir atrodami vienā hromosomas iecirknī. Tas acīmredzot ir operons. Gēni, kas kontrolē transkripciju un translāciju, ir izvietoti replikatora tuvumā. Šim faktam, domājams, ir arī funkcionāla nozīme. Līdz šim kartētie gēni hromosomā nav izvietoti vienmērīgi. Vismazāk gēnu atrasts DNS replikācijas terminēšanas iecirknī. Nav izslēgts, ka daļai no baktērijas hromosomas nepiemīt kodējoša, bet kāda cita funkcija.

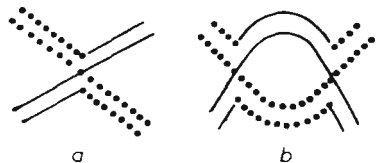
Bez *E. coli* F<sup>+</sup> un *Hfr* celmiem, kas satur attiecīgi autonomu vai integrētu F plazmīdu, ir atrastas arī rekombinantas F plazmīdas. Tās kopā ar F plazmīdas DNS satur arī baktērijas hromosomas fragmentu, kura garums nereti ievērojami pārsniedz plazmīdas garumu (pat līdz 50% no baktērijas hromosomas). Šādas rekombinantas F plazmīdas sauc par F' faktoriem (arī F—merogenota, F—genota). Tās veidojas homologiskās rekombinācijas ceļā starp identiskām F plazmīdas integrācijas vietām (IS elementiem). Homologiskās rekombinācijas rezultātā F plazmīdas ģenētiskās informācijas daudzums nesamazinās, un, konjugējot ar F<sup>-</sup> baktēriju, tā pārnes ievērojamu baktērijas genoma daļu. Recipientā baktērija kļūst daļēji diploīda.

## 4.8. KRUSTMIJAS MEHĀNISMS

Jau 20. gadsimta sākumā tika izteikta doma, ka saistīto gēnu rekombinācija notiek tad, kad novēro hiasmas, t. i., mejozes profāzē I. 1971. gadā Dž. Džonss, pētot mejozi taisnspārņiem ar autoradiogrāfijas metodi, tēviņiem nimfas stadijā ievadīja ar  $^3\text{H}$  iezīmētu timidīnu pēdējās pirmsmejozes mitozes S perioda laikā. Mejozei sākoties, katrā hromosomā bija viena iezīmēta un viena neiezīmēta hromatīda, bet mejozes anafāzē I varēja novērot iezīmētā materiāla parādīšanos arī uz neiezīmētās hromatīdas tajās vietās, kur profāzē I ir bijusi hiasma (4.16. att.). Apmainīto hromosomu iecirkņņu bija divas reizes mazāk par hiasmu vidējo skaitu attiecīgajā iecirknī. Krustmija acīmredzot nevar sākties pirms homologisko hromosomu sinapses (zigotēnas stadijas beigās), bet, sākot ar diplotēnu, kad novēro hiasmas, krustmijai jau jānoslēdzas. Tātad krustmija notiek pahitēnas laikā, varbūt — vēlā zigotēnā. Netieši to apstiprina pētījumi par polinukleotidīgāzes aktivitāti, kura atjauno fosfodiestersaiti starp mejoziskās endonukleāzes sarautās DNS 5' hidroksilēto galu un 3' fosforilēto galu. Šī aktivitāte pieaug pirmsmejoziskās interfāzes un profāzes I laikā līdz pahitēnas vidum, pēc tam strauji samazinās.



4.16. att. Siseņa *Stenophyma grossum* mejozes anafāzē I. Tikai viena hromatīda katrā hromosomā pirmsmejozes mitozē iezīmēta ar radioaktīvo timidīnu, taču krustmijas rezultātā radioaktīvais timidīns parādījies arī neiezīmētajā hromatīdā.



4.17. att. Hiacintes mejozes profāzē I veidojošies bivalenti un tajos novērotās hiasmas (zīmējums veidots, mainot fokusu).

Notiekot vienkāršajai krustmijai, homologisko hromosomu bivalentā izveidojas viena hiasma, un no bivalentā esošajām četrām hromatīdām (tetrādes) divas nemāsu hromatīdas apmainās ar iecirkņiem, bet divas pārējās nemāsu hromatīdas paliek nemainīgas. Pēc abiem mejoziskās dalīšanās cikliem izveidojas četras gametas — divas ar sākotnējo gēnu sastāvu un

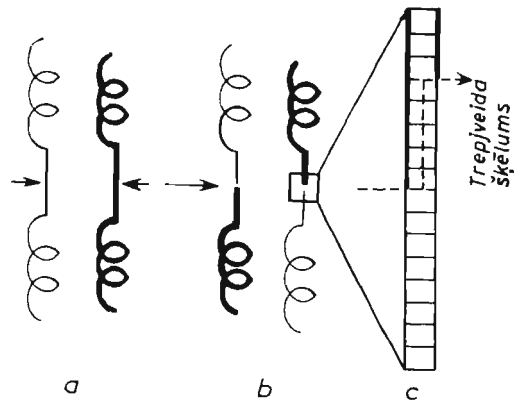
divas rekombinantas. Tātad, ja kādai heterozigotai krustmija notiktu visās (100%) šūnās, tikai 50% no gametām būtu rekombinantas. Tā kā krustmija nenotiek visās šūnās, bet daudz retāk (sevišķi, ja gēni atrodas tuvu viens otram), tad analizējošajā krustošanā vienmēr iegūst mazāk par 50% rekombinanto pēcnācēju.

Pastāv daudzas hipotēzes par krustmijas mehānismu. Pēc vienas

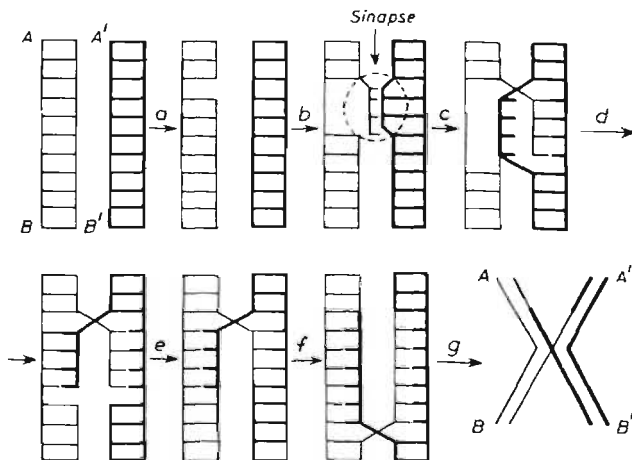
no pirmajām, ko 1909. gadā izvirzīja F. Janssens un tālāk attīstīja S. Darlington (1920—1937), homologiskajām konjugējošām hromosomām spiralizējoties un savstarpēji savijoties, tās var pārtrūkt un pēc tam apmainīties ar homologiskām daļām, veidojot hiasmas. Šo hiasmotipijas hipotēzi apstiprināja citoloģiskie morfoloģiski iezīmētu hromosomu izturēšanās novērojumi mejozē, kas parāda, ka abpus hiasmai konjugē māshromatīdas, kuras pieder vienai homologiskajai hromosomai, tātad tieši hiasma ir krustmijas rezultāts, nevis otrādi (4.17. att.).

Pārrāvuma vietā vienas hromatīdas DNS dubultspirāles gals savienojas ar pārrautās DNS galu homologajā hromatīdā (4.18. att. a). Pēc hiasmas sabrukšanas katra jaunā dubultspirāle satur sākotnējo DNS molekulu daļas (4.18. att. b). Ir izpētīts, ka krustmijas vietā komplementāro pavedienu apvienojums ir trepjuveidīgs un aptver vairākus tūkstošus nukleotīdu (4.18. att. c). Pie tam DNS saraušana un atkalapvienošana ir tik precīza, ka homologiskās rekombinācijas laikā nezūd neviena nukleotīdu atlikums. Procesa nobeigumā fosfodiesterasaišu pārrāvumus saslēdz ligāze.

Ir pierādīts, ka krustmiju var iniciēt pārrāvums vienas DNS



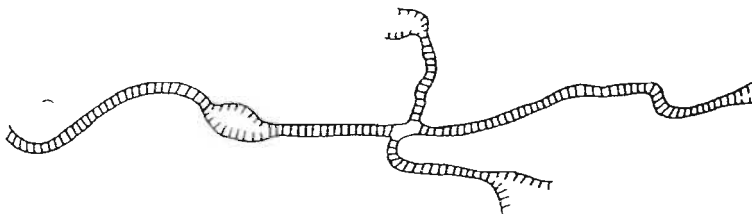
4.18. att. Ģenētiskā rekombinācija starp divām homologiskām hromosomām.



4.19. att. Krustmijas sākuma etapu hipotētiska shēma.

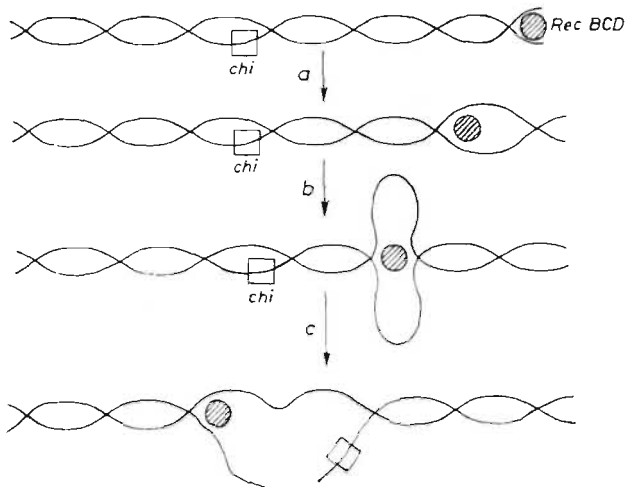
dubultspirāles vienā pavedienā (4.19. att. a). Sākot no pārrāvuma vietas, ar DNS pavedienu saistās un to atvij polifunkcionāls proteīns rekombināze (4.19. att. b). Prokariotos atvīšana notiek 5'-3' virzienā, bet eikariotos — 3'-5' virzienā. Viena no rekombināzes pamatīpašībām ir tās spēja apmainīt homologiskas virknes starp vpDNS un dpDNS (4.19. att. c). Rekombinācijas starpprodukts visbiežāk ir divas blakusorientētas DNS dubultspirāles ar pārkrustotām virknēm (4.19. att. d). Tāpēc uzskata, ka pārkrustošānās laikā endonukleāze sarauj DNS pavedienu arī recipientās DNS dubultspirālē. Atbrīvotais pavediens hibridizējas ar komplementāriem nukleotīdiem donora DNS molekulā. Seko pārrāvumu līgēšana (4.19. att. e), sazarojuma migrēšana (4.19. att. f) un pārkrustotu DNS pavedienu veidošanās (4.19. att. g). Pirmais šādu pārkrustotu DNS eksistenci prokariotiem pierādīja R. Holidejs (4.20. att.). Vēlāk šādas DNS struktūras atrada arī eikariotiem. Tāpēc homologiskās rekombinācijas starpproduktu ar pārkrustotām virknēm sauc par Holideja krustu jeb Holideja savienojumu. Jāatzīmē, ka dažu Holideja savienojuma veidošanās etapu molekulārais mehānisms vēl nav izpētīts. Piemēram, nav izolēta un izpētīta donora DNS pavedienu šķeļošā endonukleāze. Nav izslēgts, ka dažādos organismos atsevišķi krustmijas etapi ir atšķirīgi. Homologiskās rekombinācijas mehānisms, izmantojot baktērijas mutantus ar defektu vispārējā rekombinācijā, vislabāk ir izpētīts *E. coli*. Šādu pētījumu rezultātā ir identificēti apmēram 10 *E. coli* gēni, kas kodē rekombinācijai nepieciešamos proteīnus.

Eksperimentos ar bakteriofāga  $\lambda$  un tā mutantu DNS ir atrasts, ka vienpavediena pārrāvumu, pie kura var iniciēties homologiskā rekombinācija, katalizē *E. coli* proteīns RecBCD. ATF klātbūtnē RecBCD saistās ar dpDNS galu (4.21. att. a) un pārvietojas starp komplementāriem DNS pavedieniem, atvijot DNS dubultspirāli kustības virzienā un aizvijot to aiz sevis. Atvīšanas ātrums ir lielāks ( $300 \text{ nt sec}^{-1}$ ) nekā aizvīšanas ātrums ( $200 \text{ nt sec}^{-1}$ ), tāpēc RecBCD atrašanās vietā veidojas divas vienpavediena DNS cilpas (4.21. att. b). Ja vp DNS cilpā nukleotīdu secība ir 5' GCTGGTGG 3', kas nosaukta par *chi* saiti (angļu *crossover hotspot instigation* — krustmijas karsto punktu provocētājs), RecBCD funkcionē kā endonukleāze, kas šķēļ fosfodiestersaiti 4—6 nukleotīdu attālumā no *chi* saita uz 3' gala pusi. Pēc tam RecBCD pārvietojas tālāk un,



4.20. att. Plazmīdu rekombinācijas starpprodukts (zīmējums no mikrofotogrāfijas).

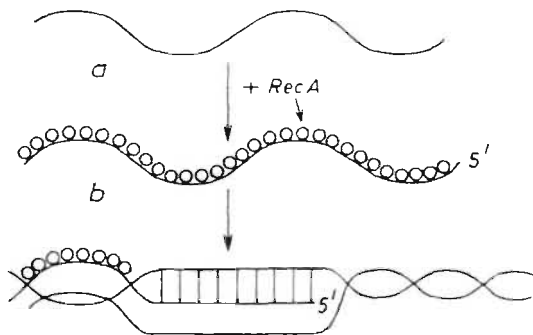




4.21. att. *E. coli* RecBCD proteīna hipotētisks darbības mehānisms.

sākot ar pārrāvuma vietu, izspiež no dubultspirāles vp DNS galu (4.21. att. c). Atbrīvotais pavediens var iedarboties ar *E. coli* rekombināzi (*recA* gēna kodēto proteīnu) un ievadīt homologisku rekombināciju.

*chi* saitam līdzīga nukleotīdu secība, pie kuras DNS vienu pavedienu šķēļ RecBCD, atrasta arī *E. coli* DNS. Radniecīgu nukleotīdu secību ar vienādu funkciju sauc par konteksta secību jeb konsensa sekvenču. Līdz šim ir identificēti vairāki *E. coli chi* konsensi, piemēram, 5' ACTGGTGG 3', 5' GTTGGTGG 3' un 5' GCTAGTGG 3'. Baktērijas hromosomā tie atrodami ik pēc 5—10 kb. Pēdējos gados līdzīgi *chi* konsensi atrasti arī citiem prokariotiem

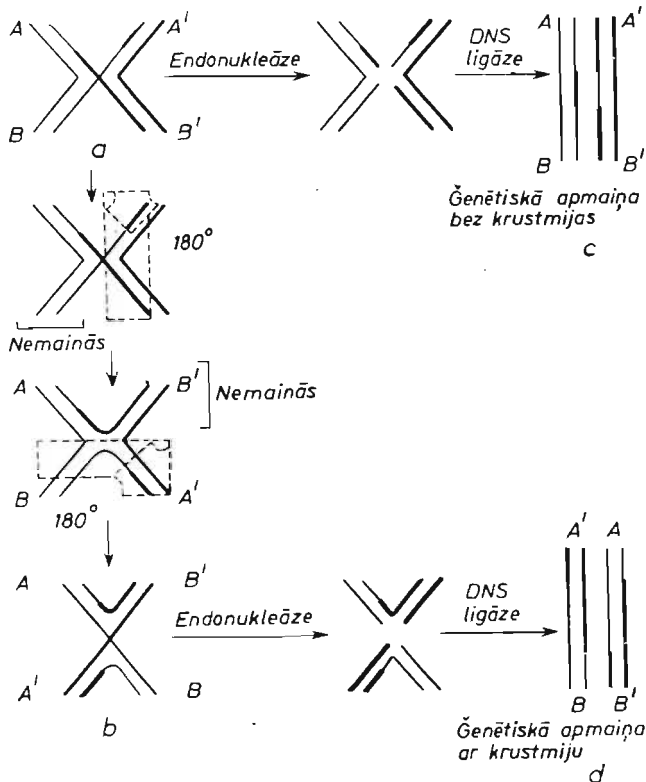


4.22. att. *E. coli* RecA proteīna (rekombināzes) katalizētā virkņu apmaiņa divu DNS molekulu komplementārā iecirknī.

un eikariotiem. Tāpēc uzskata, ka RecBCD līdzīgi fermenti varētu funkcionēt kā vispārīgās rekombinācijas stimulatori gan prokariotiem, gan eikariotiem.

*E. coli* rekombināze, RecA, ir nepieciešama visu veidu homologiskajā rekombinācijā. Tās analogi ir atrasti arī eikarotu, tai skaitā cilvēka, šūnās.

Rekombinācijā visbūtiskākā ir RecA spēja apmainīt homologiskas DNS virknes kā starp vienas DNS dubultspirāles homologiskiem iecirkņiem, tā arī starp divām homologiskām DNS dubultspirālēm. Lai tas varētu notikt, jābūt šādiem nosacījumiem: 1) vienai no dpDNS molekulām jāsaturo vpDNS iecirknis; 2) vpDNS iecirknim jāatrodas otras dpDNS molekulas homologiskā saitā; 3) vienai no DNS molekulām apmaiņas vietā jābūt brīvam galam. Ja ir šādi nosacījumi, RecA komplekss ar vpDNS izraisa DNS dubultspirāles lokālu denaturāciju homologijas iecirknī un stimulē vpDNS hibridizāciju ar komplementāro DNS pavedienu. RecA saistīšanās ar vpDNS ir polāra un prokariotiem notiek 5'-3' virzienā, sākot ar



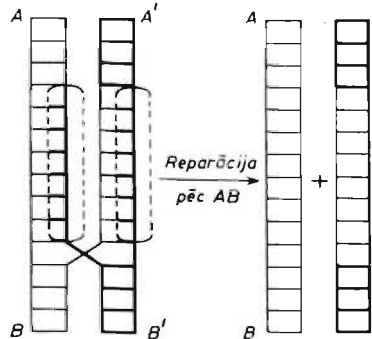
4.23. att. Krustmijas beigu etapu hipotētiska shēma (Holideja krusta izomerizācija, šķelšana un liģēšana).

vpDNS 5' galu (eikariotu rekombināze piesaistās 3'-5' virzienā). Pirmajā etapā, ko sauc par presinapsi, RecA piesaistās pie vpDNS (4.22. att. a). Pēc tam kad vpDNS presinaptiskais komplekss orientējies blakus homologiskajai dpDNS, veidojas sinapse, kurā RecA katalizē lokālu dpDNS atvīšanu un vpDNS hibridizāciju ar komplementāro dpDNS pavedienu vairākus simtus nukleotīdu garā iecirknī. Komplekss, ko sauc par D-cilpu (angļu *displacement* — aizvietošana), satur 3 DNS pavedienus (4.22. att. b). Tā veidošanās izraisa ATF hidrolīzi un D-cilpas sazarojuma ātru pagarināšanos jeb migrāciju visā homologiskā DNS iecirkņa garumā. Arī sazarojuma migrācija ir polāra un prokariotiem notiek 5'-3' virzienā. Visā migrācijas laikā notiek nepārtraukta ATF hidrolīze līdz ADF. Kā jau minēts iepriekš (sk. 4.19. att. d, e), pirms sazarojuma migrācijas acīmredzot notiek arī viena pavediena pārraušana DNS dubultspirālē, pavedienu pārkrustošanās un galu līgēšana reakcijā, ko katalizē polinukleotīdligāze.

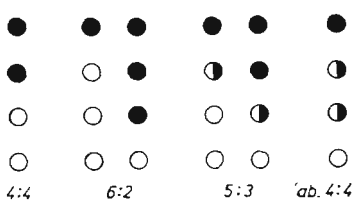
Pēc sazarojuma migrācijas abas sasaistītās DNS dubultspirāles satur divus pārkrustotus un divus nepārkrustotus pavedienus (4.23. att. a). Tie atrodas DNS superspiralizētā struktūrā, kas pieļauj pavedienu brīvu rotāciju. Var veidoties divas izomēras pavedienu formas. Izomerizācijas laikā pārmainās abu DNS pavedienu pāru savstarpējais izvietojums — divi pavedieni, kas bija pārkrustoti, kļūst par nepārkrustotiem, un otrādi (4.23. att. b).

Rekombinācijas nobeigumā Holideja savienojumi tiek pārrauti pārkrustošanās vietā un atbrīvotie gali līgēti ar polinukleotīdligāzi. Pārraušanu katalizē specifiska endonukleāze, kas pazīst DNS konformāciju, bet ne nukleotīdu secību. Šādi fermenti atrasti gan prokariotiem, gan eikariotiem. Ja sarašana notiek pirms pavedienu izomerizācijas, abas sākotnējās dubultspirāles atdalās viena no otras gandrīz nepārmainītas; nelielas pārmaiņas var būt tikai vienā pavedienā relatīvi īsā iecirknī (4.23. att. c). Ja pārkrustoto pavedienu sarašana notiek pēc izomerizācijas, katra no atbrīvotajām dubultspirālēm satur abu sākotnējo dubultspirāļu iecirkņus (4.23. att. d), respektīvi notiek reci-

proka krustmija. Ja sazarojuma migrācijas rajonā organisms ir heterozigotisks pēc dotā lokusa, šajā vietā veidojas heteroduplekss DNS. DNS reparācijas sistēmas proteīnu klātbūtnē viens no heteroduplekss pavedieniem var tikt korigēts attiecībā pret otru, izgriežot nekomplementāro nukleotīdu secību un sintezējot komplementāru. Šī procesa rezultātā notiek nereciproka krustmija, kas fenotipiski izpaužas kā gēna konversija (4.24. att.). Gēnu konversijas rezultātā savstarpēji atšķirīgās rekombinantu klases rodas nevienādā skaitā.



4.24. att. Gēnu konversijas shēma.

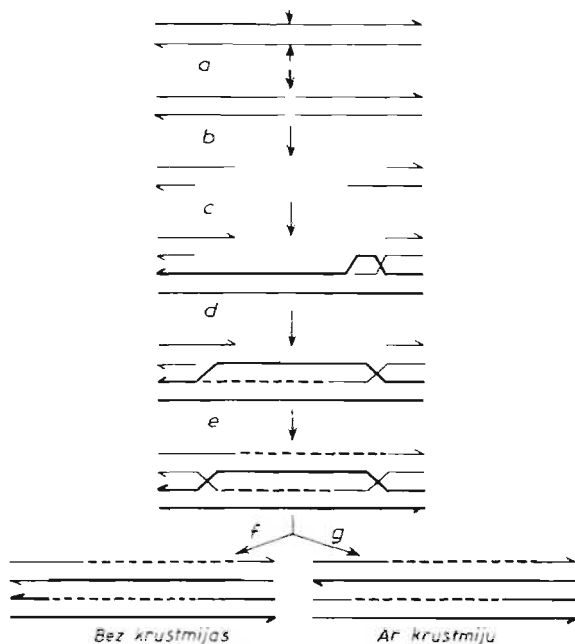


4.25. att. Sporu sadalījums pēc krustmijas heterozigotiskas pelējumsēnes askā.

Piemēram, heterozigotiskas pelējumsēnes askā 8 sporas sadalīsies nevis attiecībā 4:4, bet 6:2, t. i., 6<sup>+</sup>:2<sup>-</sup> vai 2<sup>+</sup>:6<sup>-</sup> (4.25. att.). Tātad gēnu konversija atspoguļo nreciproku informācijas pārņemšanu no viena dupleksa uz otru.

Reparācija DNS heterodupleksajā iecirknī var arī notikt. Tad katrs no DNS pavedieniem heterodupleksa rajonā satur atšķirīgu ģenētisko informāciju. Šādai sporai daloties, rodas divas atšķirīgas meitsporas. Ja askā ir viens neidentisks meitsporu pāris, segregāciju apzīmē par 5:3 segregāciju, bet, ja ir divi neidentiski meitsporu pāri, — par 4:4 (aberrantu) segregāciju. Citiem vārdiem, ja notikusi 5:3 segregācija, heterodupleksā DNS ir tikai vienā hromatīdā, bet, ja 4:4, — tā ir abās hromatīdās (4.25. att.).

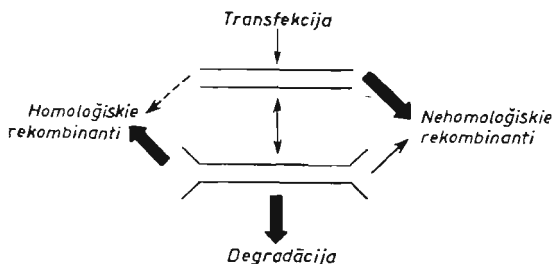
Jāievēro, ka gēnu konversija var notikt tikai relatīvi īsā DNS iecirknī (parasti viena gēna robežās), jo heteroloģija DNS rajonā, kas pārsniedz apmēram 500 bp, bloķē Holideja savienojuma migrāciju. Ārpus krustmijas iecirkņa iezīmētājgēni segregējas reciproki, t. i., 4:4.



4.26. att. Gēnu konversijas hipotētisks modelis (divpavedienu pārrāvums recipientā DNS, kam seko DNS reparācija).

Aprakstītais homoloģiskās krustmijas mehānisms nav vienīgais iespējamais. Pētījumi ar rauga mutantiem, kuros ievadīts rekombinantā plazmīdā klonēts normāls rauga gēns, liecina, ka homoloģisko rekombināciju pat vairāk tūkstošus reižu stimulē abu DNS pavedienu saraušana donora gēnā. Nav izslēgts, ka arī meiotiskās rekombinācijas starpprodukts var būt donora DNS ar pārrāvumu vai spraugu abos DNS pavedienos. Rekombinācijas procesu izskaidro hipotētisks molekulārais modelis ar diviem Holideja savienojumiem. Rekombinācija sākas ar divpavedienu pārrāvumu (to katalizē endonukleāze) vienā no hromatīdām (4.26. att. a). Pārrāvumu paplašina 5'-3' eksonukleāze. Veidojas sprauga ar 3' vienpavediena galiem (4.26. att. b). Viens no brīvajiem 3' galiem hibridizējas ar donora duplekša homoloģisku iecirkni, veidojot aizvietošanas cilpu (4.26. att. c). Tā, sākot ar 3' galu, pagarinās DNS reparatīvajā sintēzē (4.26. att. d). Ja cilpa satur tādu nukleotīdu secību, kas komplementāra spraugas otrās puses DNS pavediena 3' galam, homoloģiskie iecirkņi konjugē un jaunveidotā hibrīda 3' gals funkcionē kā iniciators otras DNS virknes reparatīvajai sintēzei uz izspiestā pavediena (4.26. att. e). Līdz ar to sprauga tiek reparēta divos vienpavediena DNS reparācijas sintēzes etapos. Sekojošā sazarojuma migrācijā un ligēšanā veidojas divi Holideja savienojumi. To šķelšana vienādos (pārkrustotos vai nepārkrustotos) pavedienos dod divus iespējamus rekombinantus bez krustmijas (4.26. att. f), bet šķelšana atšķirīgos pavedienos (pārkrustotā un nepārkrustotā) — divus iespējamus rekombinantus, kuros notikusi krustmija (4.26. att. g).

Divpavedienu pārrāvumi veicina arī homoloģisku rekombināciju eikariotu šūnu kultūrās starp eksogēnu DNS un šūnu DNS vai arī starp divām eksogēnām DNS molekulām. Tas nozīmē, ka fermenti, kas nepieciešami homoloģiskai rekombinācijai, ir normāli šūnu komponenti. Starp tiem ir endonukleāzes, eksonukleāzes, helikāzes, DNS reparācijas fermenti, rekombināzes un, iespējams, vēl citi, neidentificēti proteīni. Homoloģiskā rekombinācijā aktīvas ir lineāras, bet ne cikliskas DNS molekulas. Acīmredzot fragmentēšanās rezultātā veidojas rekombinācijai piemērots substrāts, piemēram, DNS molekulas gali. Jo lielāks DNS fragmentu galu skaits, jo lielāka ir varbūtība rekombinācijai nepieciešamo vienpavediena DNS galu veidošanai eksonukleāžu un helikāžu darbības rezultātā. Vienlaicīgi ar homoloģisku rekombināciju šūnu kultūrā notiek arī nehomoloģiska (nelikumīga) rekombinācija. Jādomā, ka nehomoloģiskā rekombinācijā notiek tieša šūnā ievadīto DNS fragmentu ligēšana. Ir pierādīts, ka nehomoloģiskā rekombinācijā nenotiek DNS dubultspirāles galu noārdīšana. Var uzskatīt, ka DNS molekulas ar neatvītiem galiem šūnā rekombinējas galvenokārt nehomoloģiski, bet DNS molekulas ar atvītiem galiem tiek iesaistītas galvenokārt homoloģiskajā rekombinācijā. Eksogēna DNS šūnā var iekļūt tikai pēc šūnu kultūras speciālas apstrādes, kā arī injicējot eksogēnu DNS šūnas citoplazmā vai kodolā caur mikrokapilāru. Šāda veida mākslīgu DNS ievadīšanu šūnā sauc par transfekciju. Transfekcētā DNS



4.27. att. Homoloģiska un nehomoloģiska rekombinācija ar eksogēnu DNS.

saglabā dubultspirāles struktūru. Šāda DNS ir substrāts nehomoloģiskai rekombinācijai (4.27. att., bulta labajā pusē). Lielākā transfekcētās DNS daļa degradējas (4.27. att., vertikālās bultas). Pirmais degradācijas starpprodukts ir DNS dubultspirāle ar atvītiem galiem. Tā var kalpot kā substrāts homoloģiskai rekombinācijai (4.27. att., bulta kreisajā pusē). Daļa no tās var renaturēties un rekombinēties nehomoloģiski (4.27. att., abos virzienos vērsta bulta), bet vairums noārdās līdz nukleotīdiem (4.27. att., vertikālā treknā bulta). Kopējais visu augšminēto procesu gala rezultāts ir DNS brīvu galu skaita samazināšana. Tātad rekombinējas tikai neliela daļa no šūnā iekļuvušās DNS. Vairāk nekā 99% no tās noārdās līdz nukleotīdiem. Acīmredzot eikariotu šūnu nukleāžu un rekombinācijas proteīnu normālā bioloģiskā funkcija ir šūnas DNS divpavedienu pārrāvumu reparācija un eksogēnas DNS noārdīšana.

Pētījumi par eikariotu šūnās transfekcētās DNS rekombināciju liecina, ka principā ir iespējams koriģēt gēnu mutācijas, šūnā ievadot eksogēnu, normālu gēnu saturošu DNS. Tas paver iespēju izstrādāt metodes iedzimto slimību ārstēšanai, ja ir identificēts slimību izraisošais defektīvais gēns. Šādu ārstēšanas metodi sauc par gēnu terapiju.

#### 4.9. JAUNU GĒNU VEIDOŠANĀS MUGURKAULNIEKU SOMATISKAJĀS ŠŪNĀS

Mugurkaulnieki satur specializētas šūnas, kuru diferenciācijas laikā notiek hromosomālās DNS iekšmolekulāra rekombinācija. Tās rezultātā veidojas jauni gēni, kādi šūnās pirms to diferenciācijas nav atrasti. Jaunveidotie gēni kodē proteīnus, kuri pazīst un piešķir saistās ar nekovalentām saitēm pie organismā iekļuvušiem mikroorganismiem (baktērijām un vīrusiem), svešām šūnām un molekulām, kā arī pie paša organisma pārmainītām, piemēram, vēža, šūnām. Šie proteīni ir saistīti ar plazmas membrānu un atrodas uz specializēto šūnu, T un B limfocītu, ārējās virsmas, vai arī tie no diferenciētiem par plazmas šūnām B limfocītiem izdalās asinsrites

sistēmā. Šie proteīni aizsargā organismu no infekciju ierosinātājiem, svešiem audiem un molekulām. Organismam svešo daļiņu un molekulu kopumu sauc par antigēniem. Savukārt asinsritē izdalītos aizsargproteīnus sauc par antivielām jeb imūnglobulīniem (Ig), ar B limfocītu plazmas membrānu saistītos imūnglobulīnus — par virsmas imūnglobulīniem (sIg; angļu *surface* — virsma), bet ar T limfocītu plazmas membrānu saistītos aizsargproteīnus — par T šūnu receptoriem (TCR; angļu *T-cell receptor* — T-šūnu uztvērējs). Limfocīti un antivielas ir daļa no organisma aizsargsistēmas, ko sauc par imūnsistēmu.

Mugurkaulnieku imūnsistēma sastāv no limfoīdiem orgāniem — kaulu smadzenēm, aizkrūts dziedzeris, liesas un limfmezgliem, no organismā brīvi cirkulējošām atsevišķām šūnām — limfocītiem un makrofāgiem un no asinsritē cirkulējošām antivielām. Limfocīti un makrofāgi veidojas no kopējas cilmšūnas. Cilmsūna vispirms diferencējas par limfoīdālo vai hemopoīētisko puscilmšūnu. Noteiktā mikrovidē vai orgānā limfoīdālā puscilmšūna diferencējas par B vai T limfocītiem, bet hemopoīētiska šūna — par makrofāgiem un citām asins šūnām. B limfocīti diferencējas kaula smadzenēs, limfmezglos un liesā. To diferenciacijas pēdējā posmā veidojas plazmas šūna, kas izdala imūnglobulīnus. T limfocīti vispirms diferencējas aizkrūts dziedzerī, bet pēc tam perifērajos limfoīdajos orgānos. Makrofāgi diferencējas kaula smadzenēs. Visas minētās šūnas ir asinīs.

T un B limfocītu diferenciacijas pirmie posmi notiek bez antigēna līdzdalības. To rezultātā veidojas T limfocīti, kas satur TCR (TCR+ T limfocīti), un B limfocīti, kas satur sIg (sIg+ B limfocīti). Šādi limfocīti var piesaistīt tādu antigēnu, kura molekulā ir TCR vai sIg antigēna saistīšanas centriem komplementārs iecirknis. Šis iecirknis ir relatīvi īss un parasti satur 10—20 monomēru (amino-skābju, cukuru) atlikumus. Antigēna iecirkni, kas saistās ar TCR vai sIg, sauc par antigēna determinanti jeb epitopu. Jebkurš makromolekulārs antigēns var saturēt daudzas determinantes. Proteīnu dabas determinantes antigēnā parasti ir atšķirīgas. Polisaharīdu dabas determinantes antigēnā bieži ir vienādas, jo vairums polisaharīdu ir uzbūvēti no atkārtotiem monomēru elementiem. Antigēnus, kuru determinantes ir vienādas un atkārtotas, sauc par polivalentiem antigēniem.

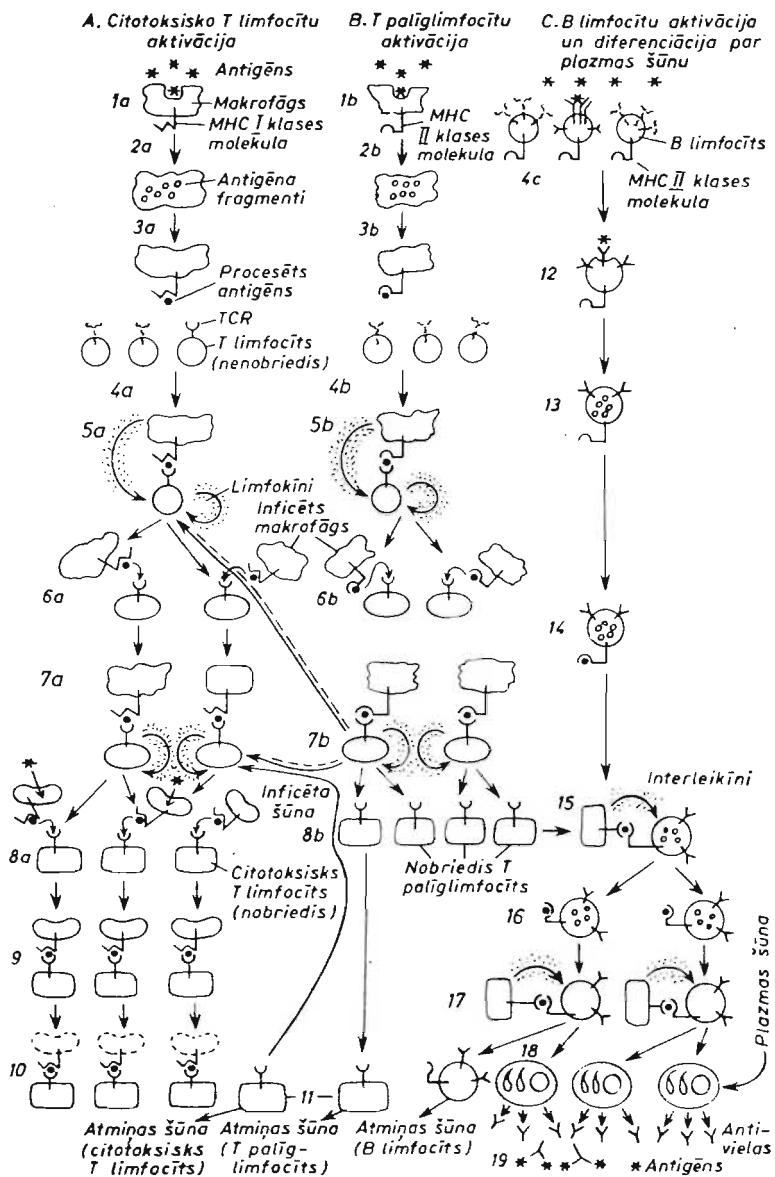
Antigēnu skaits praktiski ir neierobežots. Tāpēc neierobežotam jābūt arī specifisku T un B limfocītu skaitam. Limfocīta specifiskumu attiecībā pret antigēna determinanti nosaka TCR vai sIg molekulas uzbūve. Abu veidu antigēna receptori ir proteīni, un to uzbūves dažādības pamatā ir atšķirīga, ģenētiski determinēta amino-skābju secība. Tāfad jebkurš individuāls TCR+ T limfocīts vai sIg+ B limfocīts var atšķirties no citiem limfocītiem ar TCR vai sIg kodējošiem gēniem.

Antigēna determinantes piesaistīšana komplementāram sIg vai TCR izraisa šī limfocīta aktīvesanu, kas izpaužas tā proliferācijā. No viena limfocīta, tam daloties, veidojas daudzi identiski limfocīti,

respektīvi aktivētā limfocīta klons. Klona veidošanās no aktivētā limfocīta sauc par klonālo selekciju. Antigēna saistīšanas mehānisms pie B un T limfocītiem ir atšķirīgs. B limfocīta sIg var tieši saistīties pie komplementārās antigēna determinantes. TCR var piesaistīt tikai atsevišķu, nesaistītu ar citām, antigēna determinanti, un tikai tādā gadījumā, ja tā atrodas uz palīgšūnas virsmas kopā ar citu palīgšūnas membrānas molekulu — galvenā auda savienojamības kompleksa (MHC; angļu *major histocompatibility complex*) I vai II klases molekulu. Šo T limfocītu īpašību sauc par ierobežošanu ar MHC. Palīgšūnu, kas uz savas virsmas eksponē antigēna fragmentu kopā ar MHC molekulu, sauc par antigēna piedādītājšūnu. MHC molekulas ir glikoproteīni, kuru uzbūve katram vienas sugas individam ir atšķirīga no jebkura cita šīs sugas individa MHC molekulām (izņemot monozigotiskos dviņus). MHC molekulas ir antigēni, jo nosaka audu atgrūšanu pēc to pārstādīšanas citā tās pašas sugas organismā. MHC I klases antigēni atrodas uz daudzu šūnu virsmas. MHC II klases antigēni atrodas tikai uz specializētu šūnu (makrofāgu, B limfocītu, Langerhansa un dendritisko šūnu) virsmas. TCR<sup>+</sup> T limfocīti, kas kopā ar antigēna un MHC I klases molekulu kompleksu piesaista arī piedādītājšūnu, ir citotoksiski un nonāvē kontaktējošo šūnu, ja tā nav makrofāgs. Šādu T limfocītu subpopulāciju sauc par citotoksiskiem T limfocītiem T<sub>C</sub>. To bioloģiskā pamatfunkcija ir vīrusinficētu, organismam svešu šūnu, tajā skaitā paša organisma pārmainītu, piemēram, vēža šūnu nonāvēšana. TCR<sup>+</sup> T limfocīti, kas kopā ar antigēna un MHC II klases molekulu kompleksu ir piesaistījuši piedādītājšūnu, aktivizējas un izdala dažādus proteīnus. Izdalītie proteīni aktivizē citas blakus esošās imūnsistēmas šūnas, to skaitā B limfocītus. Proteīnus, kas veicina citu šūnu augšanu, proliferāciju vai diferenciāciju, atbilstoši izraisītājam efektam sauc par augšanas, stimulētājiem vai diferenciācijas faktoriem — kopēji par citokīniem. Limfocītu izdalītos citokīnus sauc arī par limfokīniem vai, ja tie ietekmē citu limfocītu augšanu, par interleikīniem. T limfocītu subpopulāciju, kas pēc antigēna piesaistīšanas izdala limfokīnus, sauc par T palīgšūnām T<sub>H</sub> (angļu *helper* — palīgs). To bioloģiskā pamatfunkcija ir citu organisma imūnsistēmas šūnu aktivizēšana.

Par antigēna piedādītājšūnu T<sub>C</sub> un T<sub>H</sub> limfocītiem parasti kalpo makrofāgs (4.28. att. A,B). Tas fagocitē (1a, 1b) un fragmentē antigēnu (2a, 2b). Antigēna fragmentus saista un pārnes uz plazmas membrānas ārējo virsmu MHC I klases (3a) vai MHC II klases (3b) molekula. Pie antigēna fragmenta kompleksa, kas eksponēts uz makrofāga virsmas, ar MHC molekulu piesaistās T<sub>C</sub> vai T<sub>H</sub> limfocīts (4a, 4b). Limfocīta piesaistīšana aktivizē makrofāgu. Aktivētais makrofāgs izdala interleikīnu 1 (5a, 5b), kas savukārt aktivē T limfocītu un izraisa tā proliferāciju. Veidojas T limfocītu klons (6a, 6b). Jebkurš no klona limfocītiem var piesaistīt atbilstošu antigēna piedādītājšūnu un pašstimulēties ar izdalītiem limfokīniem (7a, 7b). Vienlaicīgi notiek T limfocīta diferenciācija, kamēr izveidojas pilnīgi diferencēti, nobrieduši T limfocīti (8a, 8b). Nobriedušie MHC





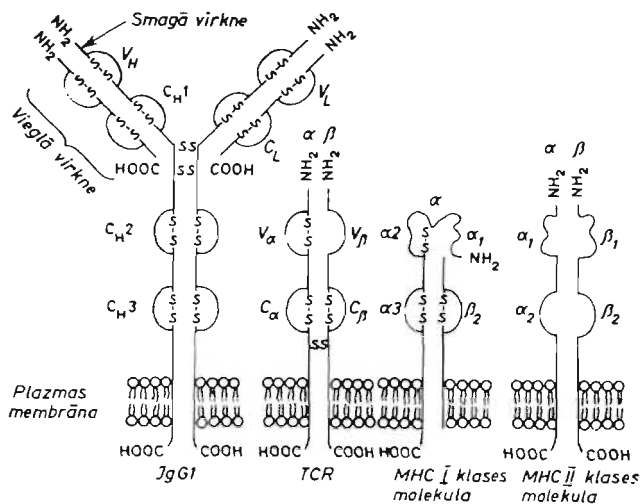
4.28. att. Limfocītu aktivācijas shēma.

I klases molekulu specifiskie  $T_C$  limfocīti saistās ar vīrusinficētu šūnu (9) un nonāvē to (10). Daži no  $T_C$  limfocītiem paliek asinsritē kā atmiņas šūnas (11). Tās pēc atkārtotas antigēna piestādītājšūnas parādīšanās organismā ātri mobilizējas un veido klonu. Tāpēc, ja organismu atkārtoti stimulē ar antigēnu, imūnā atbilde ir ātrāka un intensīvāka.

B limfocīta sIg pazīst un piesaista nepārveidotu (nefragmentētu) antigēnu (4.28. att. C). Parasti šāda piesaistīšana nav pietiekoša B limfocīta aktivēšanai (izņēmums ir polivalentie antigēni). Vairumā gadījumu, lai notiktu sIg<sup>+</sup> B limfocītu proliferācija un diferenciācija par plazmas šūnu, tos aktivizē  $T_H$  limfocīta izdalītie limfokīni. Vispirms notiek sIg<sup>+</sup> B limfocītam piesaistītā molekulārā antigēna (4c) endocinoze (12). Endocitētais antigēns fragmentējas (13) un kopā ar MHC II klases molekulu eksponējas uz B limfocīta virsmas (14). Antigēna fragmenta kompleksam ar MHC II klases molekulu piesaistās atbilstošs nobriedis  $T_H$  limfocīts (15) un izdala limfokīnus. To ietekmē B limfocīts proliferē un diferenciējas (16). Veidojas vienādu B limfocītu klons. Tā atsevišķas šūnas turpina dalīties tik ilgi, kamēr tās stimulē piesaistītie  $T_H$  limfocīti (17). Šajā laikā notiek B limfocīta diferenciēšanās par plazmas šūnu (18), kas izdala ierosinātājai antigēna determinantei specifiskus imūnglobulīnus. Tie saistās ar brīviem antigēniem un iezīmē tos vai nu izvadīšanai no organisma, vai noārdīšanai (19).

Visas aplūkotās imūnsistēmas šūnu virsmas molekulas ir ģenētiski radniecīgi proteīni vai glikoproteīni, kas sastāv no vairākām polipeptīdu virknēm. Tāpēc tās apvieno vienā imūnglobulīnu saimē.

Imūnglobulīnu saimes molekulu īpašības un veidošanās vislabāk izpētītas pelēm. Tipiska imūnglobulīna molekula sastāv no 4 polipeptīdu virknēm — divām identiskām vieglajām (L; angļu *light* — viegls) un divām identiskām smagajām (H; angļu *heavy* — smags) virknēm. Virknes savstarpēji saista disulfīda saites. Ir divu veidu vieglās virknes,  $\kappa$  un  $\lambda$ , bet vienā un tajā pašā Ig molekulā tās ir identiskas vai nu divas  $\kappa$ , vai arī divas  $\lambda$ . Visu mugurkaulnieku limfocītos ir 5 smago virkņu klases jeb izotipi:  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  un  $\alpha$ . Peļu B limfocītos ir vairākas  $\gamma$  virkņu apakšklases —  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2a$ ,  $\gamma 2b$  un  $\gamma 3$ . Atsevišķā antivielas molekulā ir divas vienas un tās pašas klases (vai apakšklases) smagās virknes. Smagā virkne nosaka plazmas šūnas sekretēto imūnglobulīna veidu — IgM, IgD, IgG, IgE un IgA. Piemēram, zīmējumā (4.29. att.) parādītā peļu imūnglobulīna molekula (IgG1) sastāv no divām  $\gamma 1$  smagajām virknēm un divām vienādām ( $\kappa$  vai  $\lambda$ ) vieglajām virknēm. Antivielas molekula sastāv no atsevišķiem domēniem. Vienas vieglās virknes N gals kopā ar vienas smagās virknes N galu apmēram 110 aminoskābju atlikumu garumā veido antigēna saistīšanas centru. Tajā aminoskābju secība dažādām antivielām ir atšķirīga. Tāpēc šo molekulas daļu sauc par variablo iecirkni (V) un apzīmē ar atbilstošās virknes indeksu ( $V_L$  vai  $V_H$ ). Pārējā polipeptīdu virkņu daļa dažādām antivielu molekulām ir līdzīga. Tāpēc to sauc par molekulas konstanto daļu (C) un apzīmē vieglajai virknei ar  $C_L$ , bet smagajai



4.29. att. Imūnglobulīnu saimes molekulu uzbūves shēma.

virknei — ar  $C_{H1}$ . Smagā virkne bez tam satur vairākus citus funkcionāli atšķirīgus domēnus (zīmējumā  $C_{H2}$  un  $C_{H3}$ ).

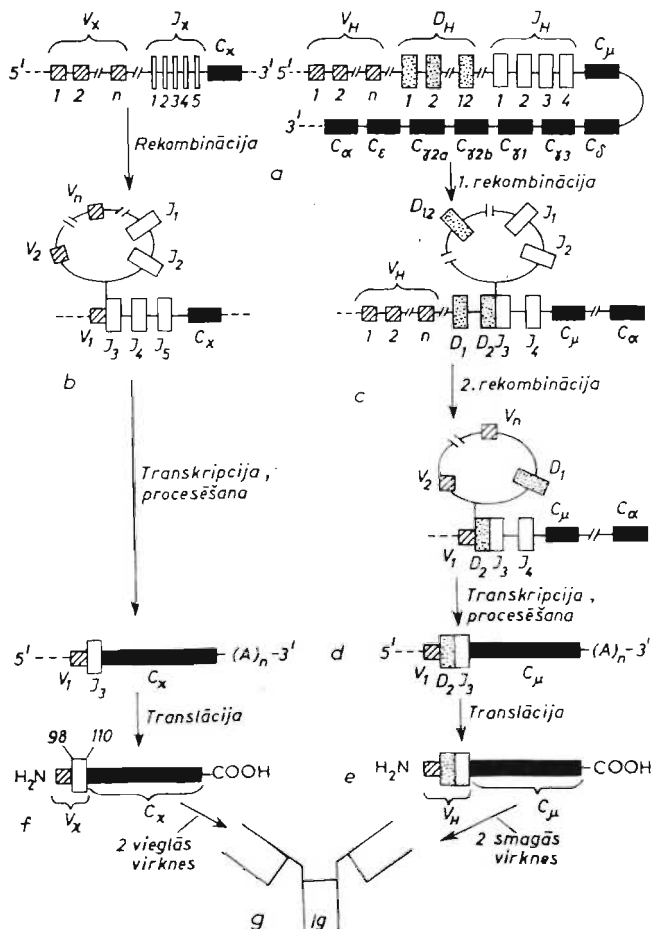
T šūnu receptors (TCR) sastāv no divām atšķirīgām polipeptīdu virknēm, vai nu  $\alpha$  un  $\beta$ , vai  $\gamma$  un  $\delta$ . Abas virknes saista disulfīda saite. Abu polipeptīdu virkņu N gali veido TCR variablu domēnu ( $V_{\alpha}$  un  $V_{\beta}$ ), kas, piedaloties MHC molekulai, funkcionē kā antigēna receptors. Vairāk nekā 99% peļu T limfocītu TCR satur  $\alpha$  un  $\beta$  virknes. T limfocītus, kuru TCR sastāv no  $\gamma$  un  $\delta$  virknēm, parasti atrod starp epitēlijšūnām, kur tie funkcionē kā citotoksiskas šūnas.

Audu savienojamības kompleksa (MHC) proteīni ir polimorfiski, un to gēni atrodas vienā, MHC lokusā. Pelēm šis lokuss atrodas 17. hromosomā un aizņem apmēram 4000 kb. Tajā ir 33 MHC I klases gēni un septiņi MHC II klases gēni. MHC I klases molekulas sastāv no divām polipeptīdu virknēm. Tikai vienu no tām,  $\alpha$  virkni, kodē MHC lokusa gēns. Otrā, vieglā, virkne ir  $\beta_2$ -mikroglobulīns. To kodē 2. hromosomas gēns. Dažādas virknes atšķiras molekulas N galā, kur ir divi domēni,  $\alpha_1$  un  $\alpha_2$ . Tuvāk plazmas membrānai ir molekulas konstantā daļa  $\alpha_3$ , kas ir līdzīga imūnglobulīnu konstantajiem domēniem.  $\beta_2$ -mikroglobulīns nav saistīts ar plazmas membrānu, un pie  $\alpha$  virknes tas piesaistās nekovalenti. MHC II klases molekulas sastāv no divām polipeptīdu virknēm  $\alpha$  un  $\beta$ . Katru no tām kodē atsevišķs MHC lokusa gēns. Dažādu MHC II klases molekulu aminoskābju secība atšķiras to N gala domēnos,  $\alpha_1$  un  $\beta_1$ . Tuvāk plazmas membrānai ir konstantie domēni  $\alpha_2$  un  $\beta_2$ .

**Imūnglobulīnu un T šūnu receptoru gēnu veidošanās un ekspresija.** T un B limfocīti var veidot receptorus, kas pazīst un saista jebkuru, arī mākslīgu antigēnu un tā determinanti. Tā kā katru

receptora polipeptīdu kodē atsevišķs gēns, Ig un TCR gēnu skaitam šūnas genomā jābūt ļoti liels, praktiski neierobežotam. Tas nav iespējams, jo faktiskais gēnu skaits dzīvnieka šūnā nepārsniedz 100 000. Arī eksperimentāli ne dzimumšūnās, ne arī vairumā somatisko šūnu Ig un TCR veidojošo polipeptīdu kodējošie gēni nav atrosti. Tie ir atrosti tikai limfocītos noteiktā to diferenciācijas stadijā. Katrs individuāls limfocīts var sintezēt imūnglobulīnus vai TCR tikai pret vienu noteiktu antigēna determinanti, un katrā limfocītā tā gēna daļa, kas kodē Ig vai TCR variablo domēnu, ir atšķirīga no variablā domēna citos limfocītos. Tātad organisma spēju veidot dažādām antigēna determinantēm komplementāras molekulas nosaka limfocītu skaits. Piemēram, pelei ir  $3 \times 10^8$  limfocīti. No tiem apmēram  $\frac{2}{3}$  ir T limfocīti un  $\frac{1}{3}$  — B limfocīti. Pēc antigēna iekļūšanas organismā tā determinante saistās tikai ar tāda limfocīta receptoru, kura saistīšanās centrs ir komplementārs antigēna molekulas daļai. Pēc tam notiek šī limfocīta klonāla selekcija, B limfocīta diferenciācija par plazmas šūnu un specifiskas antivielas izdalīšanās no tās.

Pastāv vairākas hipotēzes par imūnglobulīnu un TCR gēnu veidošanos limfocītā. Saskaņā ar vienu no tām Ig un TCR variablos (V) iecirkņus kodē daudzi atsevišķi gēni, bet konstantos iecirkņus (C) — viens gēns. Limfocīta diferenciācijas laikā viens no V gēniem rekombinējas ar C gēnu un veido unikālu polipeptīdu kodējošu gēnu. Otrās hipotēzes pamatā ir pieņēmums, ka Ig un TCR polipeptīdus kodējošo gēnu variablos iecirkņos limfocīta diferenciācijas laikā stipri palielinās mutāciju daudzums, kas nosaka Ig un TCR gēnu variablo iecirkņu atšķirību katrā limfocītā. Pārbaudot šīs hipotēzes eksperimentāli, konstatēja, ka pareizais ir abas. Vispirms tika pētīta peļu imūnglobulīnu gēnu veidošanās. Ig kodējošo gēnu nukleotīdu secības tika salīdzinātas antivielas producējošās peļu plazmas šūnās, šo šūnu priekšteču diferenciācijas starpformās un embrionālās šūnās un konstatēja, ka Ig vieglo virkni kodē trīs DNS iecirkņi: konstanto daļu C gēns,  $V_L$  daļas C galu — J gēns un  $V_L$  daļas N galu — V gēns. Ig smago virkni kodē četri DNS iecirkņi: konstanto daļu C gēns,  $V_H$  C galu — divi gēni J un D un  $V_H$  N galu — V gēns. V, D un J gēni ir vairāki, un tie atrodas atsevišķos lokusos (4.30. att., a). Katras Ig virknes veidošanai nepieciešamie gēnu lokusi ir atsevišķās hromosomās. Piemēram, vieglo  $\kappa$  virkņu veidošanai nepieciešamie lokusi pelēm ir 6. hromosomā, vieglo  $\lambda$  virkņu veidošanai — 16. hromosomā, smago virkņu veidošanai — 12. hromosomā. Visi smago virkņu izotipu gēni ir lokalizēti vienā, apmēram 200 kb garā DNS iecirknī. Dzimumšūnās un kaulu smadzeņu šūnās V, D un J gēnu lokusi ir atdalīti ar DNS iestarpinājumiem, kuru garums var pārsniegt vairākus desmitus kb. Limfocītu pus-cilmšūnu diferenciācijas laikā par B limfocītiem notiek intragenomiska DNS rekombinācija, kuras rezultātā izšķēļas DNS iecirkņi starp V un J lokusiem, ja veidojas vieglo virkņu gēni, un starp D un J, pēc tam starp V un DJ, ja veidojas Ig smago virkņu gēni. Veidojoties vieglās virknes gēnam, viens no daudziem V gēniem



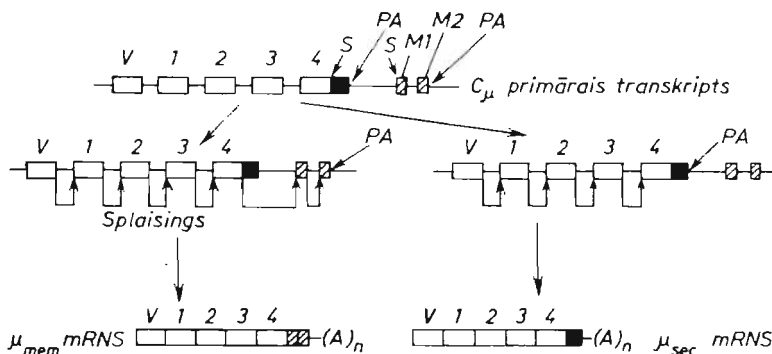
4.30. att. Imūnglobulīna gēna veidošanās un ekspresijas shēma.

apvienojas ar vienu no  $J$  (4.30. att. b). Veidojoties smagās virknes gēnam, viens no daudziem  $V$  apvienojas ar vienu no  $J$ , pēc tam  $DJ$  ar vienu no  $V$  (4.30. att. c). Atsevišķo  $V$ ,  $J$  un  $D$  ligēšanas vietas nav precīzi fiksētas, tāpēc gēnu apvienošanās laikā var veidoties ļoti daudzi varianti ar atšķirīgu nukleotīdu secību.  $C$  gēns vienmēr ir lokalizēts netālu no  $J$  gēna un ietilpst kopējā transkriptonā. Limfocīta diferenciācijas laikā vispirms veidojas  $Ig$  smagās virknes gēns. Tajā tūlīt aiz  $J$  ir  $C_{\mu}$ , kas transkribējas kā pirmais no izotīpiem. No transkribētās hnRNS tās procesēšanās laikā izskaldās starp kodējošiem iecirkņiem atlikušie nukleotīdi un veidojas  $Ig$  smagās virknes  $\mu$  izotipa mRNS (4.30. att. d). Ribosomās tā translējas par polipeptīdu (4.30. att. e). Polipeptīds procesējas Goldži

kompleksā un izdalās šūnas citoplazmā. Limfocītu, kas citoplazmā satur Ig smagās virknes  $\mu$  izotipu, sauc par pre-B limfocītu. Tikai pēc tam ekspresējas Ig vieglās virknes (vai nu  $\kappa$ , vai  $\lambda$ ) (4.30. att. f), apvienojas ar smagās virknes  $\mu$  izotipu (4.30. att. g). Veidojas Ig, kas pārvietojas uz plazmas membrānu. Limfocīts kļūst par B limfocītu.

Peles genomā ir 90—300  $V\kappa$ ,  $4J\kappa$ ,  $2V\lambda$ ,  $3J\lambda$ , 100—200  $V_H$ ,  $12D_H$  un  $4J_H$  gēni. Veidojoties Ig smagajai virknei, tās dažādu variantu skaits ar  $200V_H$ ,  $12D_H$  un  $4J_H$  gēniem ir 9600. Variantu skaits ar  $300V\kappa$  un  $4J\kappa$  gēniem ir 1200. Pēc smago un vieglo virkņu apvienošanās kopējais Ig variantu skaits ir lielāks nekā 10 miljoni. Faktiski tas ir vēl lielāks, jo variantu daudzumu palielina neprecizitātes ligēšanā un DNS pārkārtošanās laikā novērotais pastiprinātais somatisko mutāciju daudzums. Viens no mutāciju izraisītājiem iemesliem acimredzot ir limfocītos atrodamā terminālā dezoksīnukleotidil-transferāze, kas pirms ligēšanas atsevišķiem  $V$ ,  $J$  un  $D$  fragmentiem var pievienot papildu nukleotīdus.

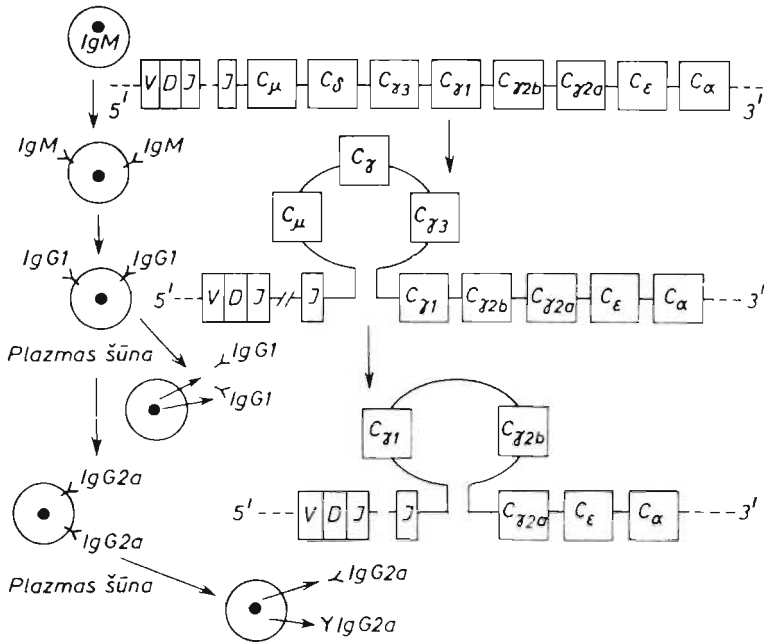
Ja organismā esošā antigēna daudzums ir pietiekoši liels, B limfocīts diferenciējas par plazmas šūnu, kas sekretē imūnglobulīnus (antivielas). Ir noskaidrots, ka abu veidu Ig — sIg un Ig — kodē viens un tas pats smagās virknes gēns, bet atšķirīgas ir Ig un sIg mRNS. Ig mRNS ir īsāka nekā sIg mRNS un 3' galā nesatur divus eksonus  $M_1$  un  $M_2$ , kas kodē hidroforu polipeptīdu. Hidroforais polipeptīds Ig transporta laikā aiztur to plazmas membrānā. Abu veidu mRNS rodas primārā transkripta procesēšanas laikā. Ig smagās virknes primārais transkripts satur divus poliadenilēšanas saitus (PA), kā arī splaisa donora un akceptora saitus (S) (4.31. att.). Transkripta procesēšanas laikā var notikt vairākas konkurējošas reakcijas: poliadenilēšana pirmajā vai otrajā poliadenilēšanas saitā un splaisings. B limfocītā notiek splaisings un veidojas  $\mu$  mRNS, kas 3' galā satur eksonus  $M_1$  un  $M_2$ . Ribosomās tā translējas par sIg smago virkni. Plazmas šūnās splaisings nenotiek, primārais Ig



4.31. att. Virsmas un sekretējamo imūnglobulīnu mRNS veidošanās shēma.

B limfocīta  
diferenciacija

Imūnglobulīnu izotipu pārslēgšana  
(IgM → IgG1 → IgG2a)



4.32. att. Imūnglobulīnu izotipu pārslēgšanas shēma.

smagās virknes gēna transkripts poliadenilējas pirmajā PA saitā un veidojas sekretējama Ig ( $\mu_{sec}$ ) mRNS. Ribosomās tā translējas par Ig smago virkni.

B limfocīta diferencēšanas laikā par plazmas šūnu aktivējas arī C $\mu$  blakus esošais C $\delta$  gēns, kas kodē IgD. IgD ir imūnglobulīns, kas atrodas tikai uz limfocīta virsmas kā sIgD un nekad neizdalās. Tā bioloģiskā funkcija viennozīmīgi nav izpētīta. Uzskata, ka sIgD ir nepieciešams B limfocīta pārvēršanai par plazmas šūnu. Ja sIgM<sup>+</sup> limfocītu ar antigēnu stimulē atkārtoti, notiek imūnglobulīna smagās virknes gēna pārslēgšana uz vienu no C $\gamma$  izotipiem (4.32. att.). Pārslēgšana ir atkarīga no antigēna ķīmiskās dabas, palīgšūnu populācijas sastāva un B limfocīta atrašanās vietas organismā. Parasti tā notiek liesā, kur plazmas šūna sekretē vienu no IgG izotipiem. Izotipa pārslēgšanas laikā notiek rekombinācija, kuras rezultātā deletējas C $\mu$  un C $\delta$  un aktivējas viens no C $\gamma$  gēniem. Šajā laikā novēro arī papildu mutācijas gēna variablā iecirknī, kuru rezultātā IgG ar antigēnu saistās daudz ciešāk nekā ar IgM. Citiem vārdiem, sekundārās imūnās stimulēšanas laikā pieaug antivielu tieksme pret antigēnu. Citā mikrovidē C izotips var pārslēgties nevis uz C $\gamma$ , bet uz C $\alpha$ . Tad plazmas šūna sekretē IgA, kas

ir galvenā antiiviela pienā, siekalās un uz gļotādām. Savukārt, ja izotips pārslēdzas uz  $C_e$ , notiek IgE sintēze. IgE ir antiiviela, kas saistās ar noteiktiem audiem. Pēc reakcijas ar atbilstošu antigēnu audos rodas lokāla iekaisuma reakcija, kas IgE pastiprinātas veidošanās gadījumā izraisa alerģiju.

T limfocītu receptoru (TCR) gēni, līdzīgi kā imūnglobulīnu gēni, arī veidojas DNS iekšmolekulārā rekombinācijā. Piemēram, pelēm TCR  $\beta$  lokuss ir 6. hromosomā 700—800 kb garā DNS iecirknī. Tajā ir divi funkcionāli līdzvērtīgi gēna konstantās daļas ( $C$ ) iecirkņi. Katra  $C$  iecirkņa pretstraumes secībā ir viens  $D$  elements, seši  $J$  elementi un 20—30  $V$  elementi. TCR  $\gamma$  lokuss ir 13. hromosomā un satur trīs  $H\gamma$ — $C\gamma$  elementus. Pirms katra no tiem ir apmēram septiņi  $V$  segmenti.  $D$  segmentus  $\gamma$  lokuss nesatur. TCR  $\alpha$  un  $\delta$  lokusi ir 14. hromosomā un atšķiras no citiem TCR gēnu lokusiem ar to, ka daudzi TCR  $\delta$  kodējošie segmenti ir izvietoti starp  $\alpha$  gēnu veidojošiem  $V$  un  $J$  segmentiem. TCR  $\alpha$  gēna veidošanai ir 75—100  $V$  segmenti un vairāk nekā 50  $J$  segmenti. TCR  $\delta$  gēna veidošanai ir apmēram 10  $V$  segmenti un pa diviem  $D$  un  $J$  segmentiem. Visu TCR polipeptīdu gēni veidojas līdzīgi imūnglobulīnu gēniem, limfoidālās puscilmsūnas diferenciacijas laikā apvienojot pa vienu no  $V$ — $J$ — $C$  vai  $V$ — $D$ — $J$ — $C$  fragmentiem.

Citotoksisko T limfocītu ( $T_C$ ) un T palīglimfocītu ( $T_H$ ) TCR sastāv no vienas  $\alpha$  un vienas  $\beta$  polipeptīdu virknes. Tikai nelielas, apmēram 1% T limfocītu populācijas TCR sastāv no  $\gamma$  un  $\delta$  polipeptīdu virknēm. Šo T limfocītu bioloģiskā funkcija vēl nav izpētīta. Ir atklāti arī vēl citi T šūnu veidi, piemēram, supresorie T limfocīti ( $T_S$ ). Tie regulē  $T_C$  un  $T_H$  limfocītu aktivitāti. Dažādu T limfocītu subpopulāciju kopums veido organisma celulārās imunitātes sistēmu. Savukārt asinsritē cirkulējošās antiivielas pārstāv organisma humorālās imunitātes sistēmu.

Vislabāk izpētīta peļu imūnsistēma. Pētījumi par cilvēka imūnsistēmu liecina, ka pamatā tā ir līdzīga peļu imūnsistēmai. Piemēram, līdzīga ir audu savienojamības kompleksa (MHC) lokusa un T šūnu receptora  $\alpha$  un  $\beta$  virkņu lokusa organizācija, līdzīgi ir arī imūnglobulīnu gēni. Atšķirībā no peļu Ig, kuru vairums (apmēram 95%) satur  $\kappa$  vieglās virknes, cilvēka Ig satur (apmēram 40%)  $\lambda$  vieglās virknes. Ig gēnu variantu veidošanas mehānisms dažādām sugām var būt atšķirīgs. Piemēram, vistām sugām vairāk nekā 95% no Ig satur  $\lambda$  vieglās virknes. Tās veidojas, rekombinējoties vienīgajam funkcionālajam  $V\lambda$  segmentam ar vienīgo  $J\lambda$ — $C\lambda$  iecirkni. Anti-ielu dažādība vistām tomēr neatšķiras no citiem mugurkaulniekiem. Acīmredzot dažām sugām Ig varianti rodas galvenokārt pastiprinātu somatisko mutāciju rezultātā Ig gēna variablajā iecirknī.