

Specifikus mRNS izolálása és jellemzése
- egy *Drosophila* hősokk gént hordozó -
immobilizált hibrid plazmid segítségével

Doktori értekezés

Irta:

Okos Károlyné

Erdélyi Mária

Készült:



Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézetében

S z e g e d

1 9 8 0.

B 5043



E 1.981

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
RÖVIDÍTÉSEK	
1. BEVEZETÉS	1.
2. ELMÉLETI RÉSZ	4.
2.1. Génaktivitás indukálása hőszókkal	
<u>Drosophila</u> -ban	4.
2.2. RNS szintézis hőszókk után	6.
2.3. Protein szintézis hőszókk után	8.
2.4. Hőszókk gének szerveződése	11.
3. KISÉRLETI ANYAGOK	13.
3.1. <u>Drosophila</u> sejttenyészeti	13.
3.2. A sejtek jelölése 25°C és 37°C	
hőmérsékleten	13.
3.3. A sejtek frakcionálása	14.
3.4. A hőszókk fehérjék elektroforézise	15.
3.5. RNS preparálása a citoplazmából és	
a sejtmagból	15.
3.6. Citoplazmatikus és sejtmagi poli(A) ⁺	
RNS-ek izolálása	16.
3.7. RNS frakcionálás ultracentrifugálással	17.
3.8. Rádíoaktivitás mérése	18.
3.9. Diazo-benzil-oximetil-papír készítése	18.
3.9.1. NBM-papír készítése	19.
3.9.2. ABM-papír készítése	19.
3.9.3. DBM-papír készítése	19.

	Oldal
3.10. A plazmid DNS felkötése a DBM-papírra	21.
3.11. A plazmid DNS-DBM-papír titrálása ...	21.
3.12. Citoplazmatikus és sejtmagi hősokk specifikus RNS-ek izolálása DBM-papírra kötött 132E3S plazmid segítségével ..	22.
4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK	24.
4.1. <u>Drosophila</u> sejtek fehérjeszintézisének változása hősokk hatására	24.
4.2. Citoplazmatikus /1/ és sejtmagi /2/ RNS- ek izolálása ³ H/-uridinnel 25°C-on és 37°C-on jelölt <u>Drosophila</u> sejttenyé- szetből	26.
4.3. Hősokk poli/A/ ⁺ mRNS és poli/A/ ⁺ HnRNS izolálása affinitás kromatográfiával /1/, jellemzésük szaharóz grádiensben történő szedimentációjuk alapján /2/	27.
4.4. 132E3S plazmid DNS kötése DBM-papírra /1/, a felkötés ellenőrzése /2/	34.
4.5. 70 000 D hsp-t kódoló RNS szekvenciák izolálása citoplazmatikus és sejt- magi RNS-ekből	36.
4.6. Az izolált 70 000 D molekulasúlyu hsp poli/A/ ⁺ pre-mRNS-ének jellemzése sze- dimentációja alapján	40.
5. KÖVETKEZTETÉSEK	42.
5.1. Specifikus nukleinsavak izolálása és dusítása DNS-DBM filter hibridizációs technikával ...	42.

5.2. A 70 000 D hsp-t kódoló szekvenciák megoszlása a poli/A/ ⁺ és poli/A/ ⁻ ci- toplazmatikus és sejtmagi RNS osztá- lyokban	44.
6. IRODALOMJEGYZÉK	46.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezuton köszönöm meg Alföldi Lajos Intézeti Igazgatónak, hogy biztosította a feltételeket munkám elvégzésére az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetében.

Köszönöm Dr. Bajszár Györgynek munkám elméleti részéhez nyújtott utmutatását és Dr. Szabó Gábornak segítségét és irányítását a kísérleti munkában, az eredmények értékelésében és megírásában.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Udvardy Andornak, aki rendelkezésemre bocsátotta a hibrid plazmidot és így lehetővé tette az izolálási módszer kidolgozását.

Szeretnék köszönetet mondani a Genetikai Intézet dolgozóinak, akik munkám elméleti részében és gyakorlati megvalósításában, valamint technikai kivitelezésében segítséget nyújtottak.

RÖVIDÍTÉSEK

DBM-papír	Diazo-benzil-oximetil-papír
DEP	Dietilpirokarbonát
SDS	Nátrium-dodecilszulfát
EDTA	Etiléndiamintetraecetsav
TRIS	Tris/hidroximetil/aminoetán
PVS	Polivinilszulfát
NP-40	Nonidet P40
Na-ac	Nátriumacetát
DOC	Dezoxikolát
DN-áz	Dezoxiribonukleáz
NBPC	m-Nitrobenziloximetilpiridinium-Cl
ABM-papír	Aminobenziloximetil-papír
NBM-papír	Nitrobenziloximetil-papír
SSC	Nátriumklorid-Nátriumcitrát
BSA	Bovin szérumalbumin
PIPES	Piperazin N, N' -bis /2-etán-szul- fonsav/
PVP	Polivinilpirrolidon
TCA	Triklórecetsav
hsp	Hőshock protein

1. BEVEZETÉS

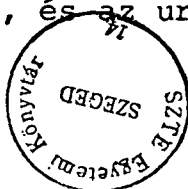
Az utóbbi időben a génműködés szabályozásának tanulmányozása során egyre jobban előtérbe kerül a poszttranszkripciós szabályozás vizsgálata. Ezen folyamat magában foglalja a primér transzkriptum szintézisétől az érett mRNS citoplazmába való kijutásáig végbemenő összes változást. Ma már elfogadott tény, hogy eukarióták esetében a primér transzkriptum nem egyezik meg a funkcióképes mRNS-sel. Komplexitása sokkal nagyobb, mérete is meghaladja az érett mRNS méretét, másrészt a molekula igen bonyolult változásokon megy keresztül /3'-5' végi modifikáció, darabolódás, splicing, degradáció/. Ahhoz, hogy ezen bonyolult folyamatokat tisztázhassuk, és a poszttranszkripciós érési folyamat pontos szabályozását megismerhessük, az első lépés az, hogy specifikus mRNS-ek és ezek sejtmagi prekursorai nagy mennyiségben álljanak a rendelkezésünkre.

Specifikus citoplazmatikus mRNS izolálásánál viszonylag könnyebb dolgunk van, mivel ott az mRNS-ek komplexitása kisebb, mint a magban, és vannak olyan speciálisan differenciált sejtek, amelyek egyféle mRNS-ből viszonylag nagy mennyiséget tartalmaznak. Ilyenek pl.: az erythroid sejtek, amelyek nagy mennyiségben tartalmaznak globin mRNS-t, a virusfertőzött sejtek esetében a citoplazmában szinte kizárólag virális mRNS-

ek találhatóak. Még kevésbé differenciált sejtekből is specifikus mRNS-eket tisztíthatunk immunprecipitációs módszerrel abban az esetben, ha az mRNS által kódolt fehérjével teljesen tiszta formában rendelkezünk.

A sejtmagi specifikus prekursor izolálása már nehezebb feladat, mivel a differenciált sejtek esetében is igen kismértékben változik a sejtmagi prekurzorok komplexitása és egyes specifikus mRNS-ek prekurzorai igen alacsony százalékban fordulnak elő a magban. Ezért ezen kismennyiségű specifikus pre-mRNS-ek detektálására és izolálására új módszereket kellett kidolgozni. Minden ilyen módszer specifikus hibridizáción alapszik. A vizsgálni kívánt specifikus mRNS-sel komplementer DNS darabot immobilizálnak valamely hordozóhoz, és ennek segítségével specifikus hibridizációval, egy heterogén RNS populációból detektálhatók a vizsgálni kívánt RNS-ek. Ezen módszerek nagy része bonyolult és rutinszerűen nem alkalmazhatók.

Munkánk célja ezért az volt, hogy rutinszerűen és egyszerűen alkalmazható módszert állítsunk be specifikus nukleinsavak izolálására és dúsítására. Erre Alwine, Kemp és Stark /1977/ által kidolgozott nukleinsav immobilizálási módszer látszott alkalmasnak. Ezen szerzők a nukleinsavat diazobenziloximetil-cellulóz papírra kötötték. A diazonium csoport reagál az egyes szálú nukleinsavval, kovalensen kötődik az azo-derivátokon keresztül, elsődlegesen kapcsolódva a guanozin 2-es szénatomjával, és az uridin 5-ös szénatomjával,



létrehozva egy rendkívül stabil nukleinsav-DBM-papír komplexet. A komplexnek e nagyfokú stabilitása miatt gondoltunk arra, hogy felhasználjuk specifikus mRNS-ek izolálására, - és további vizsgálatok céljából - bizonyos mértékű feldusítására. Így lehetővé válna a génekifejeződés szabályozásában olyan nagy szerepet játszó poszttranszkripcionális folyamatok tanulmányozása.

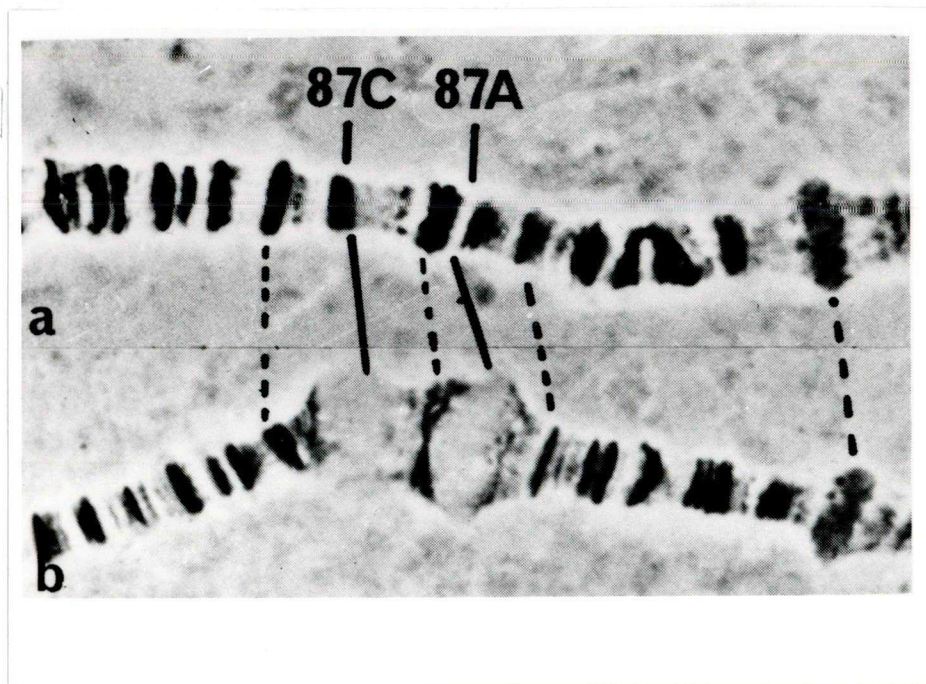
Munkánkhoz a D.melanogaster hősokk modellt használtuk fel, mivel ezen rendszer biokémiaailag és genetikailag is igen jól definiált. Másrészt pedig rendelkezésünkre állnak olyan plazmid-klónok, amelyek egyedi hősokk géneket hordoznak, ami alapját képezi egy specifikus mRNS-pre-mRNS rendszer izolálásának. Kísérletünkben a D.melanogaster 87C régiójából származó 132 E3S szubklónt használtuk fel, amely a 70 000 D molekulaszúlyú hősokk proteint kódoló szekvenciát egyszeresen tartalmazza. A modell kísérleten túl választ szeretnénk kapni munkánkból arra is, hogy a citoplazmás mRNS-eknek hány százaléka a 70 000 D molekulaszúlyú proteint kódoló mRNS, és ezen hősokk mRNS prekursorai milyen mennyiségben fordulnak elő a poli/A/⁺ és poli/A/⁻ sejtmagi RNS osztályokban. Továbbá, hogy az érett hősokk mRNS-nél /20S/ van-e nagyobb méretű prekursor a sejtmagban.

2. ELMÉLETI RÉSZ

2.1. Génaktivitás indukálása hőszokkal Drosophila-ban

Már régóta ismert az a citológiai esemény, hogy ha a D.melanogaster 25°C-on normálisan növekvő lárváit rövid ideig tartó /20-30 perc/ 37°C-os hőkezelésnek vetik alá, a nyálmirigy óriáskromoszómákon specifikus helyeken puffok indukálódnak /Ritossa, 1962/. Ugyanezt a jelenséget többen vizsgálták, a kísérletet nagyobb pontossággal megismételték /Berendes és Holt, 1964; Berendes, Van Breugel és Holt, 1965; Ashburner, 1970; Ellgaard, 1972/, és megállapították, hogy a hőmérséklet emelkedésétől számítva 5 percen belül 9 jól azonosítható lokuszban /33B, 63C, 64F, 67B, 70A, 87A, 87C, 93D és 95D/ új puffok indukálódnak. Ugyanezt a jelenséget más Drosophila fajoknál, pl.: a D.hydei-nél is megfigyelték, ahol 6 új hőindukált puff /32A, 36A, 48BC, 81B, 31C, 85B/ keletkezését írta le Berendes és Van Breugel /1965/.

A puffok indukációjának a mértéke a kezelés időtartamától és az alkalmazott hőmérséklettől függ. Az in vivo indukció nagyon gyors, már egy perccel a hőkezelés után észlelhető, bár a puffok mérete 30-40 percig fokozatosan nő, azután regresszál. A puff képződésének optimális hőmérséklete 37,5°C /Lewis és mtsai, 1975/.



1. ábra

A hősök puffok indukciója a 87A és 87C lokuszokban 37°C-on, 40 percig inkubálva a D.melanogaster szövettenyészetben

a: kontroll,

b: hősök kromoszómák

/M. Ashburner, 1979/

Tissiéres és munkatársai /1974/ kimutatták, hogy a 37°C hőkezelés nemcsak a puffokat, hanem kevésszámu /7-8/ új protein szintézisét is indukálja. Ez nemcsak a nyálmirigy sejtekben, hanem minden szövetféleségben - Drosophila sejttenyészetekben is - megtörténik. Ezzel egyidejűleg azt is megállapították, hogy nagy intenzitással specifikus RNS féleségek is képződnek azokról a lokuszokról, amelyek az óriáskromoszómákon a hőkezelés hatására puffot képeznek.

Tehát megállapítható, hogy a Drosophila-ban a hőmérséklet emelkedésére specifikus új gének indukálódnak, amelyeken aktív RNS szintézis zajlik, specifikus fehérjék megjelenését eredményezve.

2.2. RNS szintézis hősök után

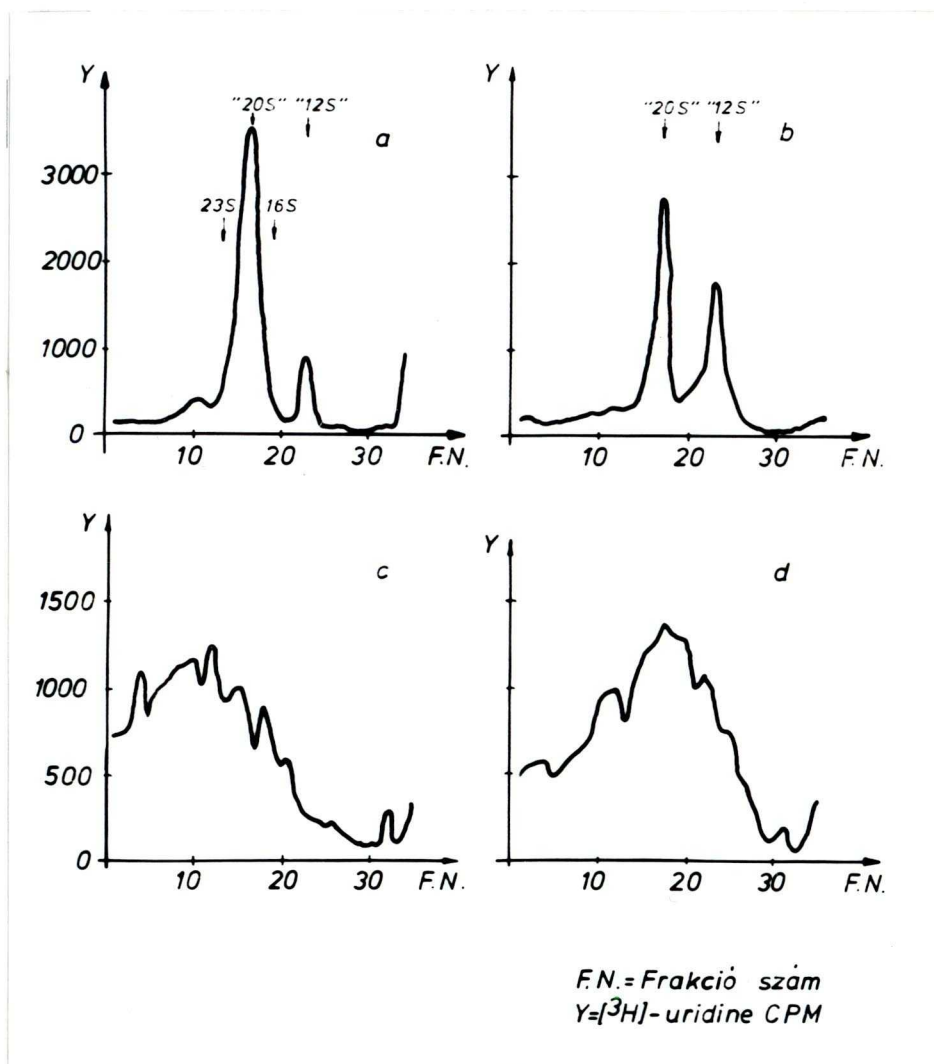
Hőkezelt Drosophila szövetek RNS szintézisében jól elkülöníthető változások figyelhetők meg :

- a/ új hősök mRNS féleségek szintézise, bár ezek nem mindegyikéről képződik új protein;
- b/ a legtöbb addig szintetizálódó mRNS féleség szintézisének megszűnése, de ez nem vonatkozik a hiszton és a mitokondriális mRNS féleségekre;
- c/ az 5S RNS és a riboszómális RNS-ek normális processingje megszűnik /Lengyel és Pardue, 1975; Rubin és Hogness, 1975/.

A fentiek arra utalnak, hogy a transzkripció profilja lényegesen megváltozik. Ezt alátámasztják egyéb megfigyelések is, pl.: a hőkezelés hatására az RNS polimeráz II. és egyéb kromoszómális proteinek megoszlása megváltozik, és ezek immunológiailag jól kimutathatóan kötődnek a hősök puffok kromoszómális helyeihez /Plagens és mtsai, 1976; Silver és Elgin, 1977/.

A hősök mRNS-ek izolálását az teszi lehetővé, hogy hőindukció hatására nagy mennyiségben jelennek meg a citoplazmában specifikus mRNS-ek, míg az egyéb mRNS-ek szintézise nagy mértékben csökken. A hősokolt

sejtekből származó poli/A/⁺ mRNS féleségeket ultracentrifugálással egy 20S és egy 12S frakciókra lehetett elkülöníteni. Ezek a frakciók hiányoztak a 25°C-on tartott sejtekből /Spradling és mtsai, 1977; McKenzie és mtsai, 1975/.



2. ábra

Drosophila poliszómális poli/A/⁺ RNS-ek ülepitése szaharóz grádiensben

- a: 37°C-on tartott D.melanogaster sejtek nagy poliszómáiból izolált
- b: 37°C-on tartott D.melanogaster sejtek kis poliszómáiból izolált
- c: 25°C-on tartott D.melanogaster sejtek nagy poliszómáiból izolált
- d: 25°C-on tartott D.melanogaster sejtek kis poliszómáiból izolált RNS-ek szedimentogramja



A szedimentogramokból látható, hogy a hősokkolt sejtek-nél a 20S mRNS frakció a nagyobb poliszómákban dominál, míg a 12S mRNS a kisebb poliszómákban több. Ezzel ellentétben 25°C-on a poliszómális mRNS-ek szedimentogramjai heterogén eloszlást mutatnak /2. ábra/.

A 20S hősokk mRNS populációt gélelektroforézissel tovább frakcionálták, és az így nyert 4 /A₁-A₄/ alfrakciót rádióaktivan jelölték, majd in situ hibridizációval az óriáskromoszómákhoz hibridizáltatták. Az alfrakciók közül az A₁ a 63BC puffra, az A₂ a 87A és 87C puffokra, az A₃ a 95D puffra, míg az A₄ elsősorban a 87C puffra hibridizált. Ezzel a módszerrel azonosították azt, hogy a 20S mRNS a nyálmirigy óriáskromoszóma mely lokuszain lokalizálódik /Ashburner, 1979/.

2.3. Protein szintézis hősokk után

A Drosophila sejteknek a hősokkra adott elsődleges válasza az, hogy az addig meglévő poliszómák majdnem teljesen disszociálódnak. Ennek az okát még nem ismerik /McKenzie és mtsai, 1975; Sondermeijer és Lubsen, 1978/. Az új poliszómák főleg a 20S és a 12S specifikus hősokk mRNS-eket tartalmazzák. Ennek megfelelően a hőkezelt Drosophila szövetek protein szintézisében is változás következik be. A legtöbb 25°C-on képződő fehérje szintézise megszűnik, és helyette kevés számú új hősokk protein szintézise indul meg nagy sebességgel /Tissiéres és mtsai, 1974; Lewis és mtsai, 1975/. A hőkezelés kezde-

te után kb. 10 perccel a $\{^{35}\text{S}\}$ -methionin jelöléssel a hősokk proteinek szintézise már kimutatható SDS-akrilamid gélelektroforézist követő autoradiográfiával. Az egyes hőindukált proteinek molekulasúlyát SDS-akrilamid gélen mutatott mobilitásuk alapján becsülték meg, és ezen az alapon 82 000, 70 000, 68 000, 36 000, 27 000, 26 000, 23 000 és 22 000 Dalton molekulasúlyú polipeptideket találtak. A hősokk specifikus fehérjék a hőmérséklet emelkedésével fokozatosan jelennek meg, míg az egyéb fehérjék szintézise fokozatosan megszűnik. A nagyobb molekulasúlyú polipeptidek /82 000, 70 000 és 68 000/ képződése már 26°C -on megindul, és leggyorsabb intenzitással 37°C -on képződnek. A kis molekulasúlyú hősokk fehérjék szintézise 35°C -on kezdődik meg. 37°C -on már a sejt szinte kizárólag hősokk specifikus polipeptideket szintetizál /3. ábra; Ashburner, 1979/. Bár az egyes irodalmi adatok kisebb eltéréseket mutattak, de abban megegyeznek, hogy a D.melanogaster-ben 8, és a D.hydei-ben 6 hősokk polipeptid indukálódik. Az egyes hősokk proteinek mennyisége eltérő, közülük a legjelentősebb a 70 000 Dalton molekulasúlyú fehérje, amely az összes hősokk proteinek kb. 50%-át adja.

A hősokkolt sejtekből származó poliszómális mRNS a hősokk puffokhoz hibridizál az óriáskromoszómákon. Ezek az RNS féleségek sejtmentes in vitro fehérjeszintetizáló rendszerben polipeptid szintézist képesek irányítani, és az így kapott proteinek mobilitása SDS-akrilamid gélen azonos az in vivo képződött hősokk proteinekével. A nagyobb polipeptideket a 20S, a kisebbeket pedig a



3. ábra

Protein szintézis hőszokk alatt, különböző hőmérsékleteken
Különböző hőmérsékleteken $\{^{35}\text{S}\}$ -metioninnal jelölt
D.melanogaster citoplazmatikus fehérjék SDS-poli-
akrilamid géljéről készült autoradiogram /Ashburner,
1979/

12S hőszokk mRNS kódolja. A hőszokkolt sejtek poliszómáiból
izolált mRNS-eket különböző klónozott hőszokk DNS szekven-
ciákhoz hibridizáltatva, majd a nem hibridizáló RNS-
eket in vitro fehérjeszintetizáló rendszerben átírva
a hőszokk proteinek közül az a protein hiányzott, ame-
lyiknek az mRNS-e hibridizált a klónozott szekvenciák-
hoz. Ily módon sikerült azonosítani, hogy a 82hsp a
63BC, a 70hsp a 87A és a 87C, a 68hsp a 95D, a 26hsp

és a 23hsp a 76B hősokk puffokhoz rendelhető /Holmgren és mtsai, megjelenés alatt; Craig és mtsai, megjelenés alatt; Livak és mtsai, 1978; McCarthy és mtsai, 1978; Schedl és mtsai, 1978/.

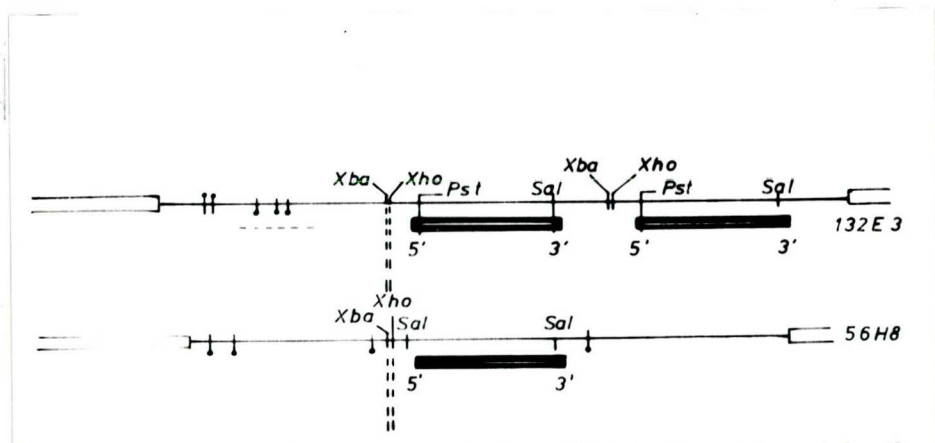
2.4. Hősokk gének szerveződése

A hősokk mRNS-ek nagyon könnyen izolálhatók, és magas specifikus rádioaktivitással jelölhetők, így lehetővé válik klónjaik izolálása Drosophila DNS-t tartalmazó rekombináns plazmidokból. Ezzel a módszerrel 4 különböző laboratóriumban sikerült hősokk gén szekvenciákat tartalmazó klónokat izolálni /Lis és mtsai, 1978; Livak és mtsai, 1978; Schedl és mtsai, 1978; Craig és mtsai, 1979/. Az utóbbiak a poliszómális hősokk mRNS-ről reverz transzkriptázzal cDNS-t készítettek, majd ezt klónozták. Eddig a 63BC, 67B, 95D és 87A/87C puffokkal komplementer klónokat izoláltak és jellemezték. A klónok analízisének eredményei röviden összefoglalva a következők :

1. a 70 000 hsp-t kódoló régió megtalálható mind a 87A, 87C helyeknél;
2. a kódoló régióknak többszörös kópiái vannak a 87A és a 87C régiókban is;
3. a 87C régióban hősokkra indukálódó ismétlődő szekvenciák találhatóak, azonban ezen RNS-ek nem transzlálódnak strukturális és fiziológiai szerepük még nem ismert;

4. a 87A és a 87C lokuszokban a hősokk mRNS-t kódoló régiók 5' végének a közelében közös DNS szekvenciák találhatóak.

A 87A és 87C puffokhoz egyaránt hibridizáló DNS klónok fizikai térképe jól ismert. A legalaposabban az 56H8 és 132E3 jelű klónokat tanulmányozták /Schedl és mtsai, 1978/. A tényleges kódoló szakasz /amely mRNS-t kódol/ 2,2-2,4 kilóbázis hosszú, és ezen belül nem mutathatók ki un. közbeeső /intervening/ szakaszok /4. ábra/. Az 56H8 klónt a 87A régióból, a 132E3 jelű klónt pedig a 87C régióból sikerült izolálni /Schedl és mtsai, 1978/. A 132E3 klón két egymástól független restriktív térkép alapján közel azonos kódoló régiót tartalmaz. A kódoló szakasz az XhoI és a SalI restriktív enzimekkel /egyidejűleg végzett emésztéssel/ kivágható a klónokból.



4. ábra 87A/87C hősokk gének szerveződése /Ashburner, 1979/

3. KISÉRLETI ANYAGOK

3.1. Drosophila sejttenyészet

Echalier KC-161 D.melanogaster /Echalier és Ohanessian, 1969/ embrionális sejteket tenyésztettünk D-20 médiumban /Echalier, 1970/. A sejteket 25°C-on szuszpenziós kulturában 2-5 x 10⁶ sejtszámig növesztettük. A passzálást két naponként végeztük.

3.2. A sejtek jelölése 25°C és 37°C hőmérsékleten

A jelölés előtt a sejteket 1 000 rpm-mel centrifugáltuk 10 percig, és megmostuk Schneider /1964/ médiummal. Majd friss Schneider médiumban óvatosan felfuszpendáltuk a sejteket, úgy, hogy ötszörös töményítést érjünk el. Ezután 25°C-on inkubáltuk a sejteket 15 percig. A kontroll sejteket 25°C-on, míg a hősokk indukcióhoz a sejteket 20 percig 37°C-on előinkubáltuk. Ezután 1,85 x 10³ Kbq/ml /³H/-uridint /UVVR 8,2 x 10² Gbq/mMol Uridint/ és abban az esetben, ha fehérjét is kívántunk jelölni, 1,48 Mbq/ml {³⁵S}-methionint /New England Nuclear, 11 x 10⁴ Gbq/mMol Methionin/ is adtunk a sejttenyészetéhez azért, hogy a hősokk megjelenését Rns és fehérje szinten is detektálhassuk. Az izotópokkal a sejteket másfél óráig inkubáltuk.

3.3. A sejtek frakcionálása

A sejtszuszpenziót a jelölés után jeges vízzel hirtelen lehűtöttük, majd centrifugáltuk /1 000 rpm, 10 percig/és kétszer mostuk hideg 0,14 M NaCl oldattal. A sejteket Levis és Penman /1977/ módszere szerint frakcionáltuk. A tenyészet magas endogén RN-áz aktivitással rendelkezik, ezért a frakcionálás során mindvégig erős RN-áz védelemben kellett dolgoznunk, hogy az RNS degradációt a minimálisra csökkentsük /DEP, PVS használata/.

A mosott és kiülepített sejteket lizis pufferben /0,03 M Tris-HCl, pH 7,8; 0,1 M NaCl; 0,002 M MgCl₂; 35 µg/ml spermin; 25 µg/ml PVS; 0,5% DEP mindig frissen bemérve/ szuszpendáltuk, és 0,5% NP-40 jelenlétében Dounce-ban homogenizáltuk. Majd 20 percig /3500 rpm/ centrifugáltuk a homogenizátumot. A felüliszót leöntve, az üledéket lizis pufferben felszuszpendálva ismét 10 percig homogenizáltuk. Közben fáziskontraszt mikroszkóppal követtük a sejtek feltárását. Kellő homogenizálás után, ismét centrifugáltuk a homogenizátumot. A kapott két szupernatant összeöntve kiegészítettük 10 mM-ig EDTA-val és 0,5%-ig SDS-sel, majd 0,1 térfogat 2 M Nátrium-acetát /pH 5,5/ és 2,5 térfogat alkohol hozzáadása után, -20°C-on tároltuk egy éjszakán keresztül. Ebből preparáltuk a citoplazmatikus RNS-eket. Az üledéket, amely a durván tisztított magokat tartalmazta, a gyors fagyasztás után /folyékony N₂/ -70°C-on tároltuk és ebből preparáltuk a sejtmagi RNS-eket.



3.4. A hősokk fehérjék elektroforézise

Az $\{^{35}\text{S}\}$ -methioninnal 25°C -on és 37°C -on jelölt sejtek esetében a sejtfractionáláskor kapott szupernatans egy részéből négy térfogat acetonnal kicsaptuk a fehérjéket. Mostuk acetonnal /90%-os/, majd éterrel és egy éjszakán át 37°C -on fehérje pufferben /0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8; 10% glicerin; 2% SDS; 5% merkaptotanol; 0,05% brómfenolkék/ tároltuk, és másnap Laemli módszere szerint /1970/ 8-14%-os grádiens SDS-akrilamid gélen elektroforizáltuk, mind a 25°C -os és a 37°C -os fehérjéket. Az elektroforézis után a gélét Schleicher-Schuell X 22735 papírra szárítottuk, és Medifort R röntgen filmen két napig exponálva autoradiogramot készítettünk.

3.5. RNS preparálása a citoplazmából és a sejtmagból

1. Henikoff és Meselson /1977/ szerint a 2,5 térfogat alkohollal kicsapott szupernatant 4 000 rpm-mel 20 percig centrifugáltuk, és a csapadékot feloldottuk a következő pufferben: 0,02 M Tris-HCl, pH 7,4; 1% SDS; 0,04 M EDTA; 0,02 M NaCl, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteínáz-K jelenlétében 10 percig 60°C -on inkubáltuk, majd további 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteínáz-K-t hozzáadva még 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A proteínáz-K-val történő kezelés után 1/5 térfogat pH 9-es 1 M Tris-HCl-t adtunk hozzá és ezután 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 és 1 mM EDTA-val telített fenollal, majd fenol:kloroform /1:1/ és kloroformmal extraháltuk. A vizes fázishoz 0,1 térfo-

gat 2 M Nátriumacetátot /pH 5,5/ adtunk és 3 térfogat alkohollal kicsaptuk a citoplazmatikus RNS-eket.

2. Az előzőekben kicentrifugált sejtmagokat először megtisztítottuk a maradék citoplazmától. Felvettük lizis pufferben /lásd fenn/ és 0,5% DOC és 1% Tween jelenlétében 5 percig homogenizáltuk Dounce-homogenizátorban. A homogenizálás után centrifugáltunk 10 percig 3 000 rpm-mel. Ezután megismételtük a fentieket. A kiültetett magokat a következő pufferben szuszpendáltuk : 0,01 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,5 M NaCl; 0,05 M MgCl₂; 50 µg/ml PVS, frissen bemérve és 40 µg/ml DN-áz jelenlétében inkubáltuk 2 percig 37°C-on. Ezután az 1% SDS-t adtunk a szuszpenzióhoz és 2 térfogat alkohollal kicsaptuk. A csapadékot 12 óráig -20°C-on állni hagytuk, majd centrifugáltuk /4 000 rpm-mel 20 percig/ és felvettük NTE pufferben /0,01 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,1 M NaCl; 0,001 M EDTA;/ 0,5% SDS jelenlétében fél óráig 200 µg/ml proteináz-K-val szobahőmérsékleten kezeltük. Ezt követte az NTE-vel telített /SDS nélkül/ fenolos, fenol:kloroformos /1:1/, és kloroformos extrakció /Spradling és mtsai, 1975a/. A vizes fázishoz 1/10 térfogat 2 M Nátriumacetátot /pH 5,5/ adva, 3 térfogat alkohollal kicsaptuk a sejtmagi RNS-eket.

3.6. Citoplazmatikus és sejtmagi poli(A)⁺ RNS-ek izolálása

A poli(A) tartalmu mRNS-ek és a /poli(A)⁺/ pre-mRNS-ek

izolálása poli/U/ Sepharose 4B affinitás kromatográfia segítségével történt /Varich és mtsai, 1976/. A minta puffer : 1% lauroyl-sarcosin, 0,03 M EDTA; a kapcsoló puffer : 0,7 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,01 M EDTA, 25% formamid; az eluáló puffer: 0,01 M K₂PO₄, pH 7,5, 0,01 M EDTA, 0,2% lauroyl-sarcosin, 90% formamid. Az RNS-eket a minta pufferben feloldottuk, majd ötszörös mennyiségű kapcsoló puffert adtunk hozzá, és egy éjszakán át kötöttük a poli/U/-Sepharose oszlophoz /1 x 7 cm/. Ezután az aspecifikus kötések megszüntetése végett a kapcsoló pufferrel mostuk az oszlopot, egészen addig, amíg az aktivitás a háttér szintjére nem csökkent. Ezután a poli/A/⁺ RNS-eket a fent említett pufferrel eluáltuk az oszlopról. A megfelelő aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtöttük, tRNS-t /20 µg/ml-t hordozó RNS-t/ adtunk hozzá, majd 1/10 térfogat /2M Nátrium-acetáttal, pH 5,5/ és 3 térfogat alkohollal kicsaptuk az RNS-eket és -70°C-on tároltuk a további felhasználásig.

3.7. RNS frakcionálás ultracentrifugálással

Az RNS-eket az alábbi pufferben oldottuk fel : /SW-27-es rotor esetében 2 ml-ben, SW-41-es rotor esetén 0,5 ml-ben/ 0,01 M Tris-HCl, pH 7,5; 0,075 M NaCl; 0,25% SDS; 0,005 M EDTA. Az 5-20%-os lineáris szaharóz grádiens /40%-os talppal/ ugyanezzel a pufferrel készült. A mintákat rárétegeztük a grádiensre. Markerként

patkánymáj citoplazmatikus RNS-t használtunk. Az ultracentrifugálás módja: Sorwall LTD-60 ultracentrifugán SW-27-es rotorban 20^oC-on 12 órát 21 000 rpm-mel, vagy SW-41-es rotorban 16 órát 21 000 rpm-mel. Ezután a lineáris grádiens felülről lefelé SW-27-es rotor esetében 1,4 ml-es, SW-41-es rotor esetében pedig 0,5 ml-es frakciókat szedve dolgoztuk fel. Az RNS grádiensben való megoszlását a minták radioaktivitásának mérése alapján detektáltuk. A grádiensekben a szedimentációs állandót pedig a marker alapján határoztuk meg.

3.8. Radioaktivitás mérése

A radioaktivan jelölt mintákból /általában /³H/-uridin/ 5-50 µl aliquotot vettünk, Whatman GF/C üvegfilterre szárítottuk, majd hideg 5%-os TCA-val és 96%-os alkohollal mostuk és ujrászárítottuk. A beütésszámot toluolos szcintillációs koktélban Packard M3320 szcintillációs számlálóban 1 percig mértük.

3.9. Diazo-benzil-oximetil-papír készítése

A cellulóz papír diazotálását James C. Alwine és munkatársai /1977/ szerint végeztük, SDS X22735 típusu papírból 2,2 cm átmérőjű kör alakú filtereket vágtunk ki.

3.9.1. NBM-papir_készítése

Négyzetcentiméterenként 0,03 g NBPC-t és 0,008 g Nátriumacetátot 0,37 ml vízben feloldottunk. A cellulóz filtereket szilikonozott küvettákba tettük, majd ráértük a méretének megfelelő mennyiséget a fenti oldatból, és 60°C-on bepároltuk. A bepárlás után még 15 percig 60°C-on tartottuk a filtereket, majd szárítószekrényben 135°C-on 35 percig szárítottuk. Ezután a papirokat desztillált vízzel 5 x 4 percig mostuk, utána 60°C-on megszáritottuk. Száradás után acetonnal mostuk 2 x 10 percig. A filterek ilyen formában vákumexikátorban, hidegszobában eltarthatók.

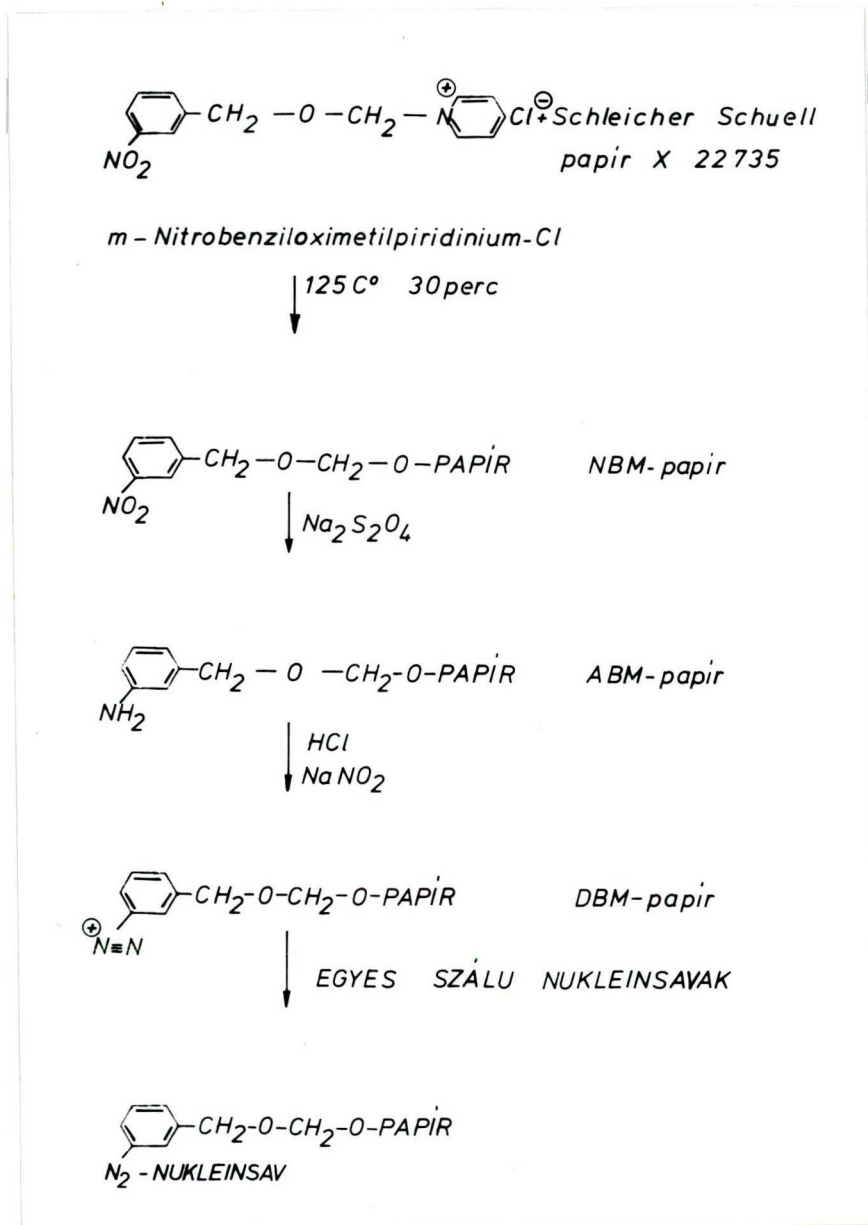
3.9.2. ABM-papir_készítése

Négyzetcentiméterenként 0,4 ml, 60°C-ra előmelegített 20%-os $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -ot mértünk a szobahőmérsékletű NBM filterekre, majd 30 percig inkubáltuk 60°C-on. A filtereket többször desztillált vízzel, 2-3 alkalommal 30%-os ecetsavval, majd újra desztillált vízzel mostuk, amíg a H_2S szag érződött.

3.9.3. DBM-papir_készítése

A diazotálási reakciót közvetlenül az egyes szálú nukleinsav rákötése előtt kell végrehajtani. Négyzetcentiméterenként 0,3 ml 1,2 N HCl és 0,01 ml NaNO_2 -t /10 mg/ml törzsoldatból, amelyet mindig frissen készítünk/ ráértünk a küvettákban levő ABM filterekre. A filtereket 0°C-on 30 percig tartottuk a fen-

ti oldatban, időnként összeráztuk. Ezután jéghideg desztillált vízzel mostuk a filtereket, majd 0,25 M Na·PO₄ /pH 6,5/ oldattal. A DBM filterek kapacitása: kb. 16-25 µg/cm². A DBM-papír készítésének menetét röviden a következőkben foglaljuk össze : 5. ábra



5. ábra DBM-papír készítésének menete

3.10. A plazmid DNS felkötése a DBM-papírra

A 132E3S rekombináns plazmidot Dr. Udvardy Andor /MTA SZBK Biokémiai Intézet/ bocsátotta rendelkezésünkre. Ez tulajdonképpen a 132E3 /Schedl, 1978/ plazmidnak egy szubklónja, amely egyszeresen tartalmazza a 87C régió hőszekvenciáit. A filterre kötés előtt a cirkuláris plazmid DNS-t HindIII-val megemésztettük azért, hogy linearizáljuk, és a denaturálás alkalmával egyes szálu DNS-t kapjunk. A denaturálást 90°C-on 7 percig végeztük, majd hirtelen lehűtöttük jeges vízben a preparátumot. Hűtés után 0,1 térfogat 2 M Nátriumacetátot /pH 5,5/ adtunk hozzá és 2,5-szeres térfogatu etilalkohollal kicsaptuk a DNS-t. Egy óra hosszáig állni hagytuk -70°C-on. A csapadékot centrifugáltuk /12 000 rpm, 10 perc/, majd feloldottuk 0,025 M Na₃PO₄ pufferben /pH 6,5/. Négy térfogat ioncserélt DMSO-t adtunk hozzá és 10 percig 80°C-on ismét denaturáltuk, majd hirtelen hűtöttük. Ezután került a DNS a frissen diazotált filterekre a szilikonozott küvetákba. Egy éjszakán át szobahőmérsékleten rázattuk, másnap a filtereket desztillált vízzel mostuk ötször, hatszor, hogy a fel nem kötődött DNS-től megszabaduljunk.

3.11. A plazmid DNS-DBM-papír titrálása

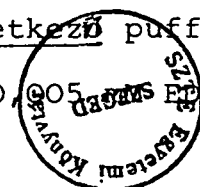
A felkötött DNS mennyiségének a pontos megállapítására a filtereket először növekvő mennyiségű jelölt

hősokk citoplazmatikus poli/A/⁺ és poli/A/⁻ RNS-ekkel hibridizáltattuk. Így megállapíthattuk azt a nukleinsav mennyiséget, amelyet a filterre felköthetünk. Ilyenkor a hibridizáló nukleinsav volt nagy feleslegben, míg az a nukleinsav amelyhez hibridizáltattunk /esetünkben a rekombináns plazmid klón/ egy meghatározott adott koncentrációban volt jelen. E mennyiség pontos megállapítására azért volt feltétlenül szükség, hogy kiküszöbölhessük a filter telteléséből származó hibákat.

3.12. Citoplazmatikus és sejtmagi hősokk specifikus RNS-ek izolálása DBM-papírra kötött 132E3S plazmid segítségével

A filter hibridizációt Denhardt /1966/ módszere szerint végeztük. A filtereket pre-hibridizáltuk 42°C-on 2 órát. A pre-hibridizációs puffer összetétele : 1% glicin; 2,5% DENHARDT oldat; 0,02 M PIPES /pH 6,4/; 50% formamid; 5 mM EDTA-Na₂; 2 x SSC; 75 µg/ml csirke vér tisztított DNS. A DENHARDT oldat: 0,02% polivinilpirrolidon 360; 0,02% BSA; 0,02% Ficoll 400.

A prehibridizáció után a filterekről leszivtuk a puffert, és a hibridizációs pufferrel néhányszor mostuk. Majd az RNS-eket /poli/A/⁺, poli/A/⁻ citoplazmatikus és sejtmagi hősokk RNS-ek, poli/A/⁺ citoplazmatikus 25°C-os RNS/ feloldottuk és 24 órát 42°C-on hibridizáltuk a filterhez kötött hősokk plazmidhoz a következő pufferben : 0,02 mM PIPES, pH 6,4; 50% formamid; 0,005 mM EDTA; 2 x SSC; 0,2% SDS.



Az eluálás előtt a filtereket alaposan mostuk, hogy az aspecifikus kötésektől megszabaduljunk. Az eluálás ugyanazon a hőmérsékleten történt.

Az eluáló puffer összetétele : 0,01 mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,005 mM EDTA; 0,2% SDS; 90% formamid. Az eluálás után a DNS-DBM-papírt alaposan mostuk a hibridizációs pufferrel. Pre-hibridizációs pufferben 4°C-on a következő hibridizációig a filterek eltarthatók /6. ábra/. A filterek többször károsodás nélkül újra használhatóak, ami nagy előnye a módszernek.



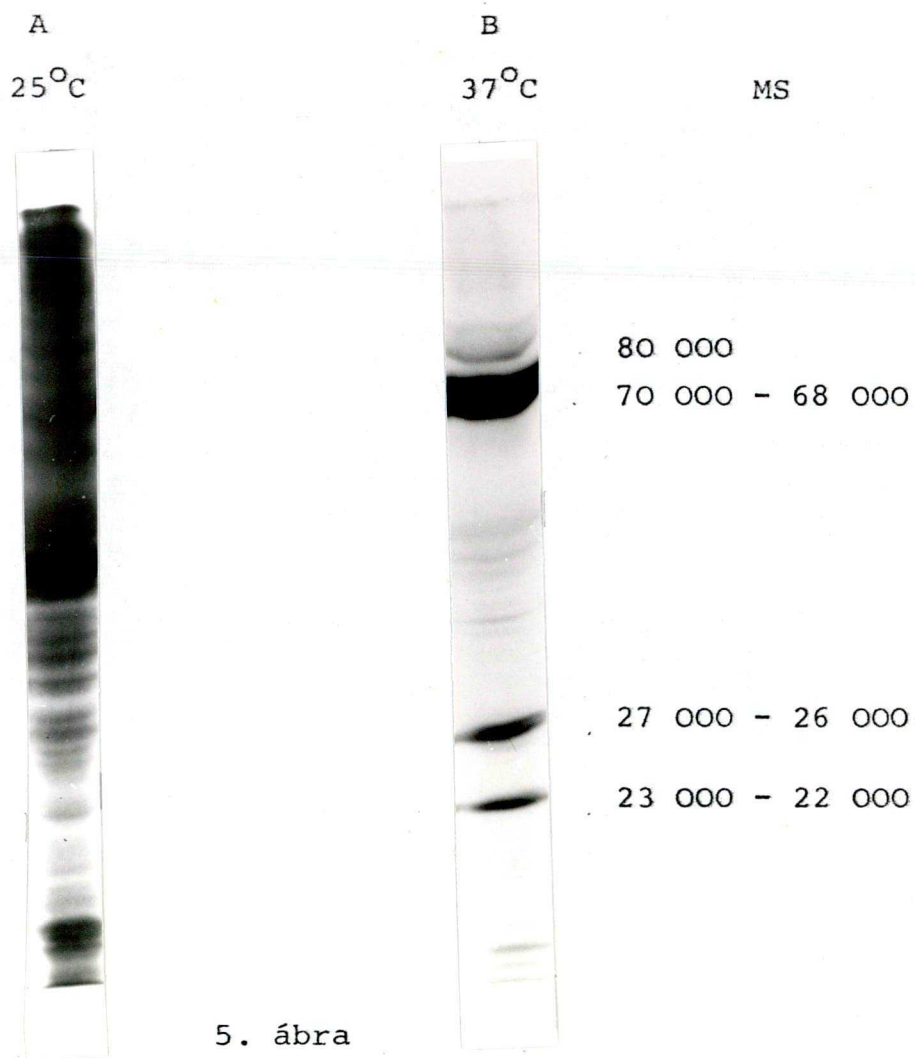
6. ábra

A DNS-DBM-papír tárolása pre-hibridizációs pufferben
4°C hőmérsékleten

4. KISÉRLETI EREDMÉNYEK

4.1. Drosophila sejtek fehérjeszintézisének változása hősokk hatására

A hőmérséklet emelésére bekövetkező fehérjeszintézis változás kimutatását a hősokk effektivitásának vizsgálatára használtuk fel. A sejtek tenyésztését, a jelölést [³⁵S]-methionin és a feltárást az előző fejezetben leírtak szerint végeztük /Kísérleti anyagok és módszerek, 14. oldal/. A szupernatansból - ami a citoplazmának felel meg - kivettünk 5 ml-t, és a fehérjét 20 ml acetonnal kicsaptuk. A csapadékot Janetzki TH 12 centrifugában lecentrifugáltuk és 4 x 500 µl acetonnal /90%-os/ majd éterrel /500 µl/ mostuk, majd felvettük az előzőekben már leírt protein pufferben /300 µl-ben/. Ebből 25 µl-t filterre szárítottunk és a szokásos módon mértük a radioaktivitást. A radioaktivitás alapján 10 µl-t vettünk ki mintánként /30 000 cpm/ és Laemli módszere szerint elektroforizáltuk 70 V-on 1 óráig és a 100 V-on 5 órát, 8-14%-os SDS poliakrilamid grádiens gélen. A gél-t SSS papírra szárítottuk, majd autoradiografáltuk. /lásd részletesebben Anyag és módszer fejezet, 15. oldal/. Az autoradiogramot az alábbiakban mellékeljük /5. ábra/.



5. ábra

Protein szintézis változása hő sokk hatására

D.melanogaster sejttenyészetben

A: {³⁵S}-methioninnal 25°C-on jelölt teljes cito-
plazmatikus fehérjék SDS poliakrilamid géljéről
készült autoradiogram

B: {³⁵S}-methioninnal 37°C-on jelölt teljes cito-
plazmatikus fehérjék SDS poliakrilamid géljéről
készült autoradiogram

/az egyes band-ek mellett feltüntetett számok a
polipeptidek molekulaszúlyát jelentik Daltonban
kifejezve/

Az autoradiogramon látható, hogy a legtöbb fehérje szintézise 37°C -on leállt, és nagy intenzitással beindult a hősokk fehérjék képződése, tehát a hősokk gének indukálása a hőmérséklet emelésével $/37^{\circ}\text{C}/$ D.melanogaster-ben sikerült.

4.2. Citoplazmatikus /1/ és sejtmagi /2/ RNS-ek izolálása $/^3\text{H}/$ -uridinnel 25°C -on és 37°C -on jelölt Drosophila sejttenyészetből

1. Echallier KC-161 D.melanogaster embrionális sejteket $2-5 \times 10^6$ sejtszámig az előző fejezetben leírtak szerint /Kísérleti anyagok és módszerek, 14. oldal/ tenyésztettük. Egy-egy kísérlethez 1-2 l tenyészetet használtunk fel. A jelölést 25°C -on és 37°C -on 3×10^7 sejt-koncentrációban $1,85 \times 10^3$ Kbg/ml $/^3\text{H}/$ -uridinnel másfél óráig végeztük /részletesebben lást az előző fejezet 14. oldalán/. Jelölés után a mosott és kiülepitett sejteket 15 ml lizis pufferben vettük fel, homogenizáltuk majd centrifugáltuk a lizátumot. Ezen eljárást még egyszer megismételtük /lásd 15. oldal/. Az így nyert 25°C -os és 37°C -os 30 ml citoplazmából RNS-t preparáltunk /lásd 15. oldal/. Egy liter 25°C -on jelölt sejtszuszpenzióból $11,1 \text{ mg}-9,7 \times 10^3 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ specifikus aktivitású citoplazmatikus RNS-t két liter 37°C -on jelölt sejtéből $23 \text{ mg}-1,85 \times 10^3 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ specifikus aktivitású hősokk citoplazmatikus RNS-t preparáltunk.

Az eltérő specifikus aktivitás oka egyrészt az, hogy két különböző kísérletből származnak az eredmények, másrészt

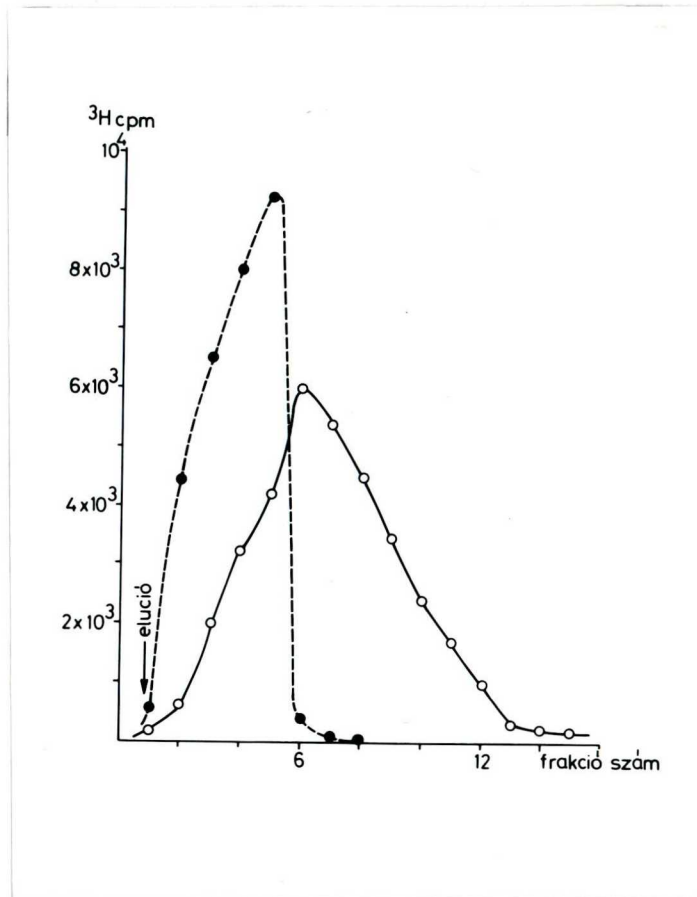
pedig hőszokk hatására a riboszómális RNS-ek szintézise és processing-je is gátolt. Tehát a hőszokk ideje alatt a citoplazmában kevés jelölt rRNS jelenik meg, és mivel a citoplazmatikus RNS-ek zömét az rRNS-ek teszik ki, ezért alacsonyabb a totál citoplazmatikus RNS-ek specifikus aktivitása 37°C -on történt jelölés során.

2. A hőszokknak alávetett D.melanogaster embrionális sejttenyészetből /2 liter/ a feltárás során kapott durva magokat tovább tisztítottuk Tween és Doc detergenssekkel. A tiszta magokat PVS jelenlétében DN-ázzal kezeltük, /2 perc, 37°C / majd SDS-t és 2 térfogat alkoholt adtunk hozzá. A keletkezett csapadékot állni hagytuk 12 órát. -20°C -on, majd centrifugáltuk /4 000 rpm-mel 20 percig/ és feloldottuk a már előzőekben leírt NFE pufferben /16. oldal/. Az oldatot szobahőmérsékleten kezeltük - 0,5% SDS jelenlétében - 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteináz-K-val és ezt követően deproteinizáltuk. A vizes fázisból 3 térfogat alkohollal kicsaptuk a sejtmagi RNS-eket. Az így kezelt sejtmagokból Spardling és munkatársai /1975/ módszerével $7,87 \text{ mg} - 2,21 \times 10^4 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ specifikus aktivitásu HnRNS-t izoláltunk.

4.3. Hőszokk poli/A/⁺ mRNS és poli/A/⁺ HnRNS izolálása affinitás kromatográfiával /1/, jellemzésük szaharóz grádiensben történő szedimentációjuk alapján /2/

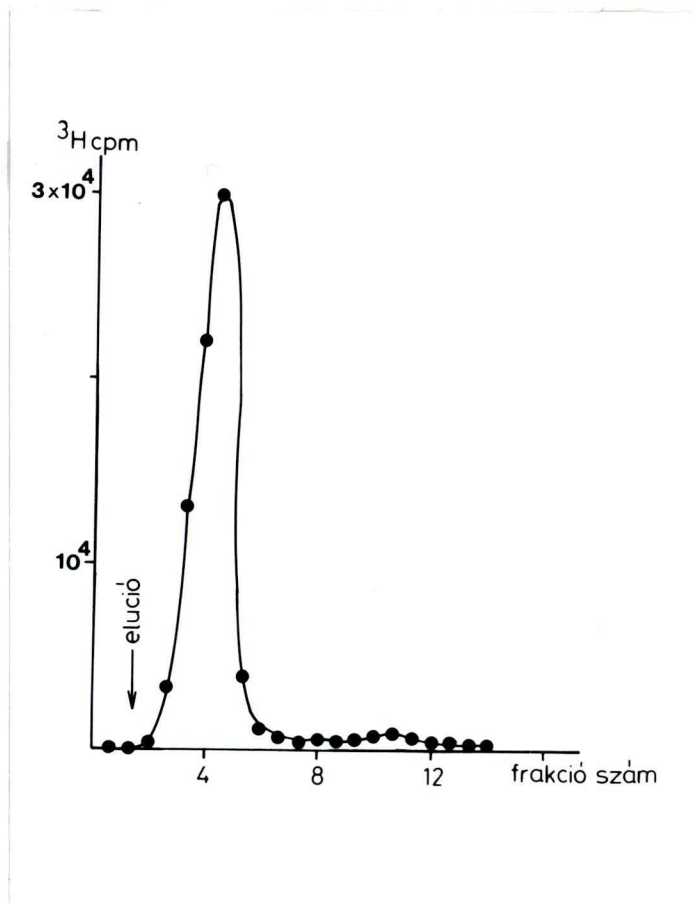
1. A 25°C -os citoplazmatikus RNS-ekből, a hőszokk citoplazmatikus és sejtmagi RNS-ekből poli/U/ Sepharose 4B affinitás kromatográfiával izoláltuk a 3' végi poli/A/

szekvenciával rendelkezőket /lásd az előző fejezetet, 17. oldal/. A kapott kromatogramokat a következő két ábra szemlélteti.



6. ábra

— hősokk poli/A/⁺ citoplazmatikus RNS
--- 25°C-os poli/A/⁺ citoplazmatikus RNS
poli/U/ Sepharose 4B affinitás kromatográfiája



7. ábra

Hősokk sejtmagi RNS-ek poli/U/ Sepharose 4B affinitás kromatográfiája

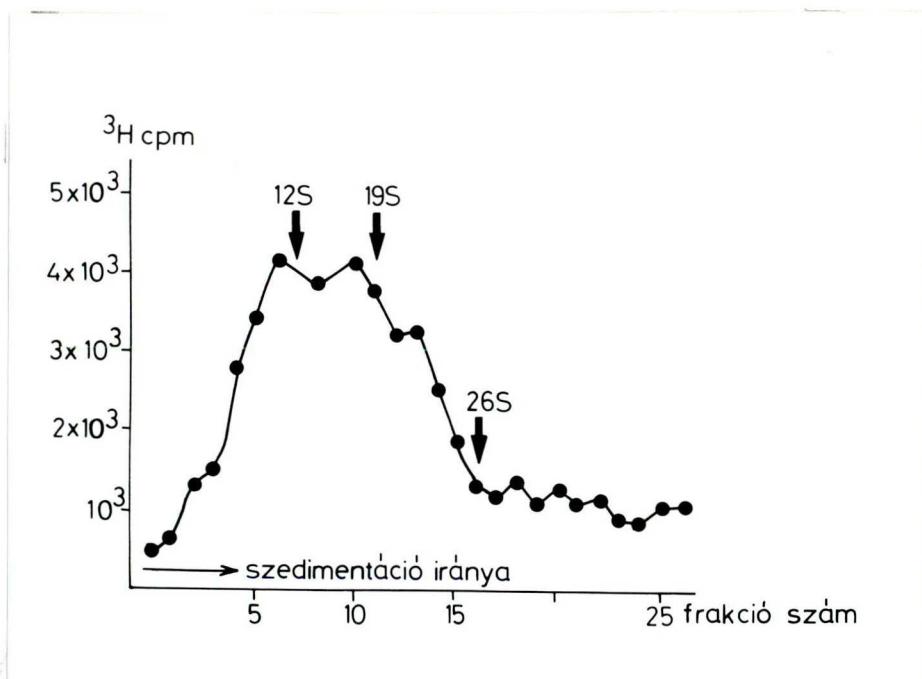
Eredményeinket a következő táblázatban foglaltuk össze :

	Felvitt RNS		Eluált poli/A/ ⁺ RNS		
	³ H cpm	µg	³ H cpm	µg	%
25°C-os citopl. RNS	1,06 x 10 ⁸	1,09 x 10 ⁴	6,09 x 10 ⁶	6,23 x 10 ²	5,6%
hősokk citopl. RNS	4,3 x 10 ⁷	2,3 x 10 ⁴	1,67 x 10 ⁶	9,57 x 10 ²	3,9%
hősokk sejtmagi RNS	1,66 x 10 ⁸	7,8 x 10 ³	5,28 x 10 ⁶	2,49 x 10 ⁴	3,1%

Az affinitási kromatográfia alapján a 25°C-os citoplazmatikus RNS-ek 5,6%-a a hősokk citoplazmatikus RNS-ek 3,8%-a 3' poli/A/ véggel rendelkezik. A hősokk sejtmagi RNS-eknek

pedig 3,1%-a a poli/A/⁺ HnRNS.

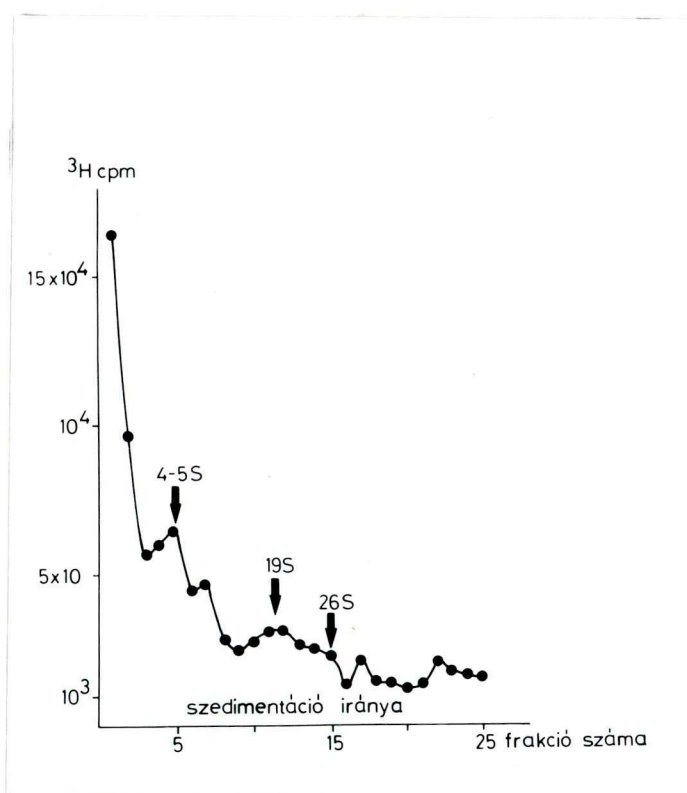
2. A 25°C-os mRNS-ek és a hősokk poli/A/⁺ és poli/A/⁻ citoplazmatikus és sejtmagi RNS-ek méret szerinti szeparálását 5-20%-os lineáris szaharóz grádiensben végeztük el /lásd részletesen 17-18. oldalon/. Kíváncsiak voltunk egyrészt arra, hogyan változik meg az RNS profil a hősokkolt sejtek citoplazmájában és a sejtmagon belül, másrészt milyen a citoplazmatikus és sejtmagi RNS-ek méret szerinti megoszlása. Ugyanakkor preparálás során keletkezett - a további hibridizáció során zavaró - degradációs termékeket is eltávolítottuk ultracentrifugálással. A 25°C-os poli/A/⁺ citoplazmatikus RNS szaharóz rádiensben az mRNS-ekre jellemző heterogén eloszlást mutat 10 S-től egészen 26 S-ig /8. ábra/.



8. ábra 25°C-os poli/A/⁺ RNS eloszlása 5-20%-os szaharóz grádiensben /SW-27 rotor, 12 óra, 21 000 rpm, 20°C/



A hősök poli/A/⁻ citoplazmatikus RNS esetében a grádi-
ensben a degradációs produktumokon és a 4-5 S RNS-en
kívül 19S és 26 S riboszómális RNS-ek láthatók. A
szedimentogramon a riboszómális RNS-ek nem dominálnak,
aminek a degradáción kívül az az oka, hogy a riboszó-
mális RNS szintézise és mag-citoplazma transzportja a
hősök hatására erőteljesen gátolt /9. ábra/.



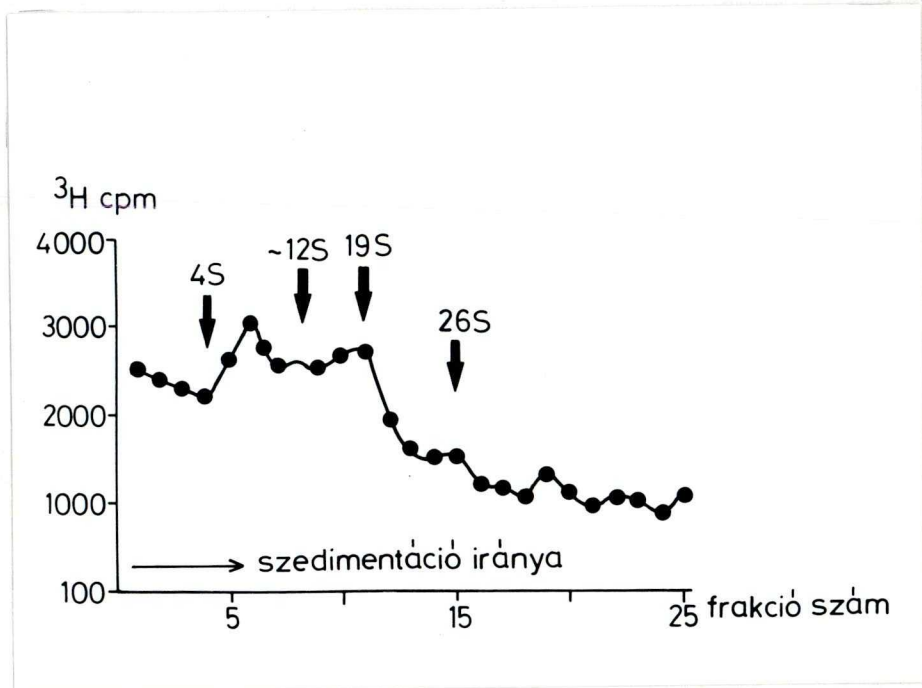
9. ábra

Hősök poli/A/⁻ citoplazmatikus RNS eloszlása

5-20%-os szaharóz grádiensben

/SW-27 rotor, 12 óra, 21 000 rpm, 20°C/

Hősök hatására a poli/A/⁺ RNS profil úgy változik,
hogy a grádiensben jól láthatóan megjelenik a 37°C-on
nagy mennyiségben indukálódó 12 S és 20 S hősök mRNS
is /10. ábra/.



10. ábra

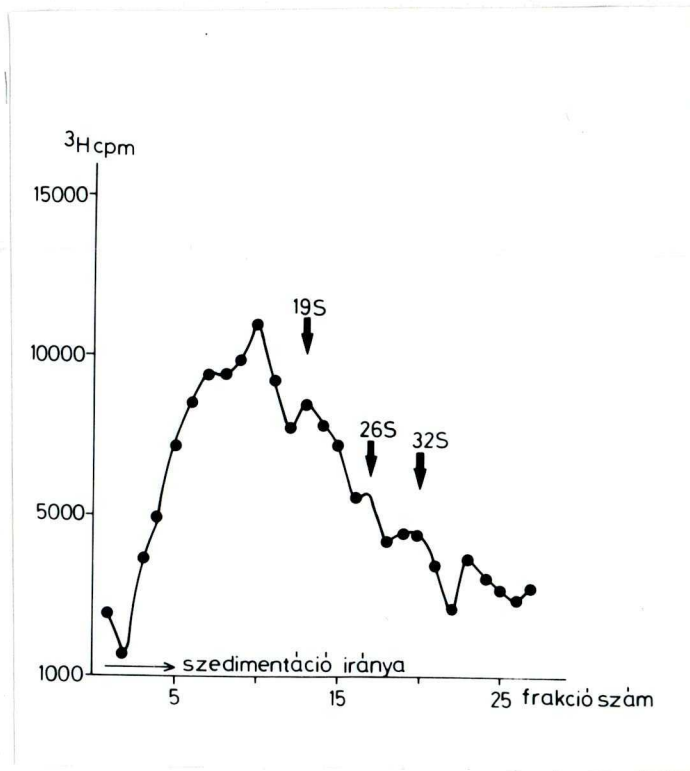
Hősokk poli/A/⁺ mRNS-ek eloszlása 5-20%-os szaharóz grádiensben

/SW-27-es rotor, 12 óra, 21 000 rpm, 20°C/

A hősokk sejtmagi RNS-ek szaharóz grádiensben heterogén megoszlást mutatnak.

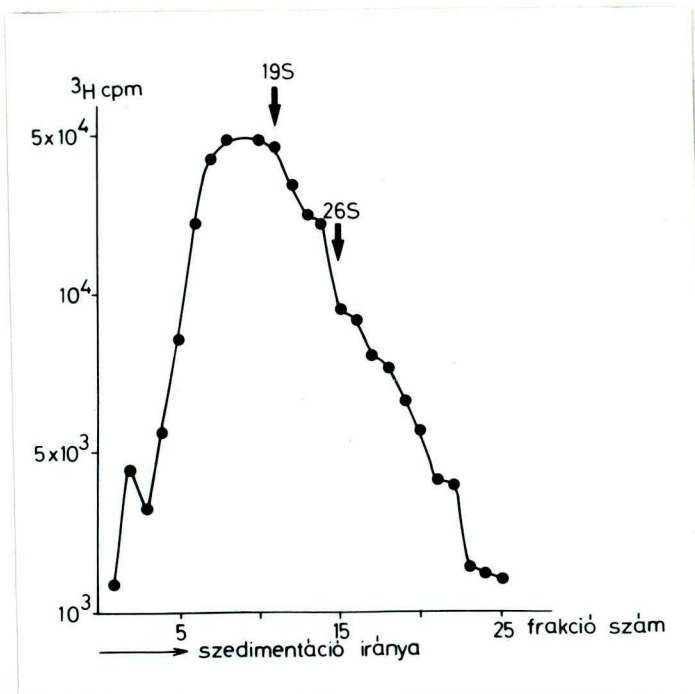
A poli/A/⁻ frakcióban diszkrét kis peak-ként jelenik meg a 19S és 26 S riboszómális RNS és azok prekursorául szolgáló 32 S RNS /11. ábra/.

A poli/A/⁺ frakció pedig heterogén peak-et képez a grádiensben 4 S-től 40 S-ig, hasonlóan a 25°C-on kapott eredményekhez /Lengyel és Penman, 1975; Levis és Penman, 1977/ /12. ábra/.



11. ábra

b Hősokk poli/A/⁻ sejtmagi RNS szedimentációja
5-20%-os szaharóz grádiens centrifugálás után
/SW-27-es rotor, 12 óra, 21 000 rpm, 20°C/



12. ábra

Hősokk poli/A/⁺ sejtmagi RNS szedimentációja
szaharóz grádiens centrifugálás után
/SW-27-es rotor, 12 óra, 21 000 rpm, 20°C/

Összefoglalva eredményeinket, az irodalmi adatokhoz hasonlóan hősök hatására a citoplazmában nagy mennyiségű hősök fehérjét kódoló 12 S és 20 S mRNS jelenik meg. Ezzel szemben a sejtmagi poli/A/⁺ RNS populációban érzékelhető változást nem lehet kimutatni.

Ezek után azt vizsgáltuk meg, hogy hősök hatására a sejtmagban milyen arányban jelenik meg a 70 000 D hsp-t kódoló RNS szekvencia, a citoplazmatikus poli/A/⁺ RNS-eknek pedig hány százaléka 70 000 D hsp mRNS. Ehhez először 132E3S plazmid DNS-t kovalens kötésben tartalmazó filtert kellett készíteni és működését ellenőrizni.

4.4. 132 E3S plazmid DNS kötése DBM-papírra /1/, a felkötés ellenőrzése /2/

1. A DBM-papírt az előzőekben leírtak szerint készítettük /Kísérleti anyagok és módszerek, 19. oldal/.

Egyszerre 10 filtert diazotáltunk. 1 g NBPC-t és 0,34 g Nátriumacetátot feloldottunk 12 ml vízben és arányosan szétosztottuk a kuvettákban lévő filterekre. Az NBM-papír után elkészítettük az ABM-papírt /40 ml 20%-os Na₂S₂O₄/, majd a DBM-papírt /10 ml 1,2 NHCl és 0,3 ml NaNO₂ /10 mg/ml/, és utána rögtön rákötöttük a denaturált 132E3S plazmid klónt. Filterenként 150 µg plazmid DNS-t használtunk felkötéshez.

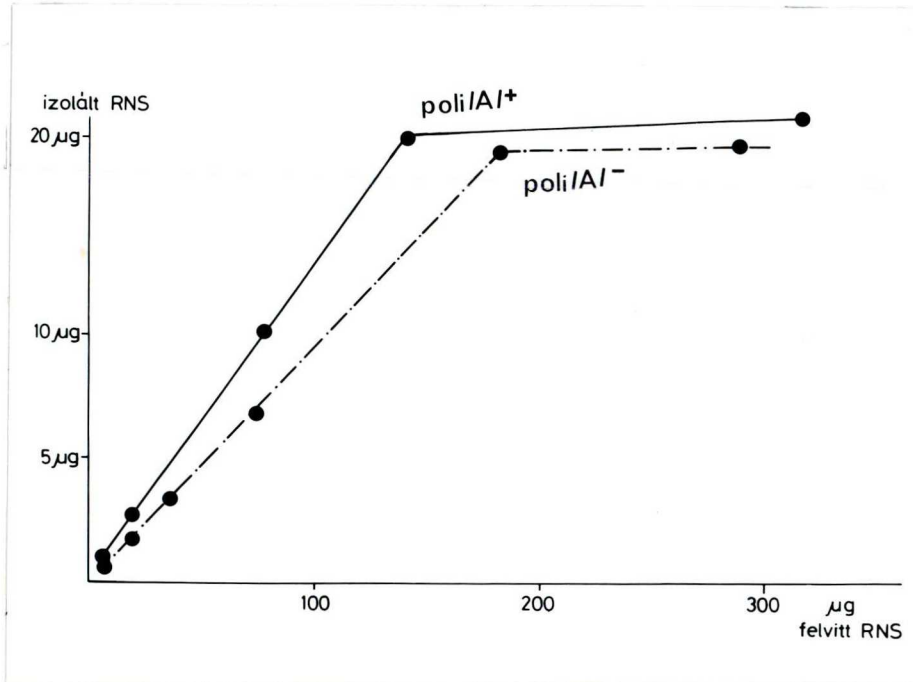
2. Kétféleképpen is ellenőriztük a felkötött plazmid DNS mennyiségét. Az egy éjszakán át tartó felkötés után a filterekről leszívtuk a reakció elegyet és

400 μ l bidesztillált vízzel alaposan leöblítettük. A leszívott reakcióelegyhez hozzátettük a 400 μ l bidesztillált vizet /amelyet az öblítés után a filterről leszívtunk/ és a 260 nm-en megmértük az abszorbciónak. A kapott értéket kivontuk a felvitt plazmid DNS mennyiségéből és így azt kaptuk, hogy filterenként kb. 100 μ g plazmid DNS kötődött fel.

A felkötött plazmid DNS mennyiség meghatározásának másik - pontosabb - módja a filter titrálása hibridizációs technika segítségével.

Különböző mennyiségű jelzett hősokk citoplazmatikus RNS-eket hibridizáltattunk a filterekhez és megállapítottuk, hogy hol van a filter telítési értéke. Ez az az RNS mennyiség, amit a filter maximálisan specifikusan meg tud kötni. A specifikus aktivitások alapján számoltuk ki, hogy az eluált RNS hány μ g-nak felelt meg, azt kaptuk, hogy a filter telítési értéke 20 μ g.

Ezzel a módszerrel megállapítható, hogy egy filter maximálisan 20 μ g 70 000 D hsp-t kódoló RNS-t képes megkötni. Hibridizációs kísérleteinket tehát ennek figyelembevételével kellett megtervezni azért, hogy kiküszöböljük a filter túltelítését /13. ábra/.



13. ábra

132E3S plazmid DNS-t tartalmazó DBM-papír titrálása poly(A)⁺ és poly(A)⁻ hősokk citoplazmatikus RNS-sel
abszcissza: felvitt RNS mennyisége µg-ban;
ordináta : hibridizált RNS mennyisége µg-ban

A titrálási görbén jól látható, hogy 20 µg-nál több RNS nem hibridizált a DBM-papírra kötött plazmid DNS-hez, ezzel a papírral maximálisan 20 µg 70 000 D hsp-t kódoló RNS-t tudunk izolálni.

4.5. 70 000 D hsp-t kódoló RNS szekvenciák izolálása citoplazmatikus és sejtmagi RNS-ekből

A 132E3S plazmid DNS-t tartalmazó filterhez való hibridizációt az előzőekben leírtak szerint végeztük el. A kísérlet sorozatban citoplazmatikus hősokk

poli/A/⁺ és poli/A/⁻ RNS-eket, valamint a poli/A/-t tartalmazó és poli/A/-t nem tartalmazó hősokk HnRNS-eket hibridizáltunk a 132E3S plazmid DNS-t tartalmazó filterekhez. A hibridizáció és a DBM-papír aspecifikus nukleinsav kötő képességének az abszolút kontrolljául a 25°C-os poli/A/⁺ citoplazmatikus RNS-ek hibridizációját tekintettük, azért, mert 25°C-on a citoplazmában nincsenek 70 000 D molekulasúlyu hősokk fehérjét kódoló mRNS-ek, tehát specifikus hibridizáció a hősokk gén szekvenciákhoz nem lehetséges. Az RNS-ek csak aspecifikusan kötődhetnek a DNS-DBM-papírra, és ennek mértéke jelzi az izolálási módszerünk alkalmazhatóságát. .

Eredményeinket a 38. oldalon lévő táblázatban foglaltuk össze. .

A táblázat adatából jól látható, hogy a 25°C-on szintetizálódó mRNS-ek között nem található hősokk szekvencia. A kontroll /25°C/ mRNS-eknek csak 0,04%-a hibridizál a 132E3S plazmidhoz. Ez az adat bizonyítja azt, hogy 25°C-on a 70 000 D molekulasúlyu hsp-t kódoló hősokk gének D.melanogaster-ben nem aktívak, nem működnek, nem képződik róluk HnRNS és természetesen mRNS sem.

Ugyanakkor, ha összehasonlítjuk ezt az értéket /0,04%/ a hősokk poli/A/⁺ és poli/A/⁻ citoplazmatikus és sejtmagi RNS-ek hibridizációjára kapott értékkel látható, hogy több nagyságrendi különbség van közöttük. Ez azt bizonyítja, hogy a specifikus mRNS és pre-mRNS

25°C-os poli/A/ ⁺ citoplazmás mRNS				
Hibr. felvitt		Izolált		%
cpm	µg	cpm	µg	
22.047.720	2.254,6	9.280	0,948	0,04

poli/A/ ⁺ hősök citoplazmás mRNS				
Hibr. felvitt		Izolált		%
cpm	µg	cpm	µg	
12.002	6,49	2.024	1,09	16,8
36.007	19,46	5.760	3,11	15,9
72.014	38,93	10.604	5,73	14,7
144.027	77,85	21.500	11,62	14,9
265.000	143,24	38.000	20,5	14,7

poli/A/ ⁻ hősök citoplazmás RNS				
Hibr. felvitt		Izolált		%
cpm	µg	cpm	µg	
11.824	6,39	1.250	0,68	10,6
35.474	19,17	3.500	1,89	9,91
71.124	38,44	7.104	3,84	9,98
142.248	76,89	14.250	7,7	10,01
342.500	185,14	36.750	19,86	10,7

poli/A/ ⁺ hősokk HnRNS				
Hibr.felvitt		Izolált		%
cpm	µg	cpm	µg	
1.287.876	60,76	15.872	0,74	1,23

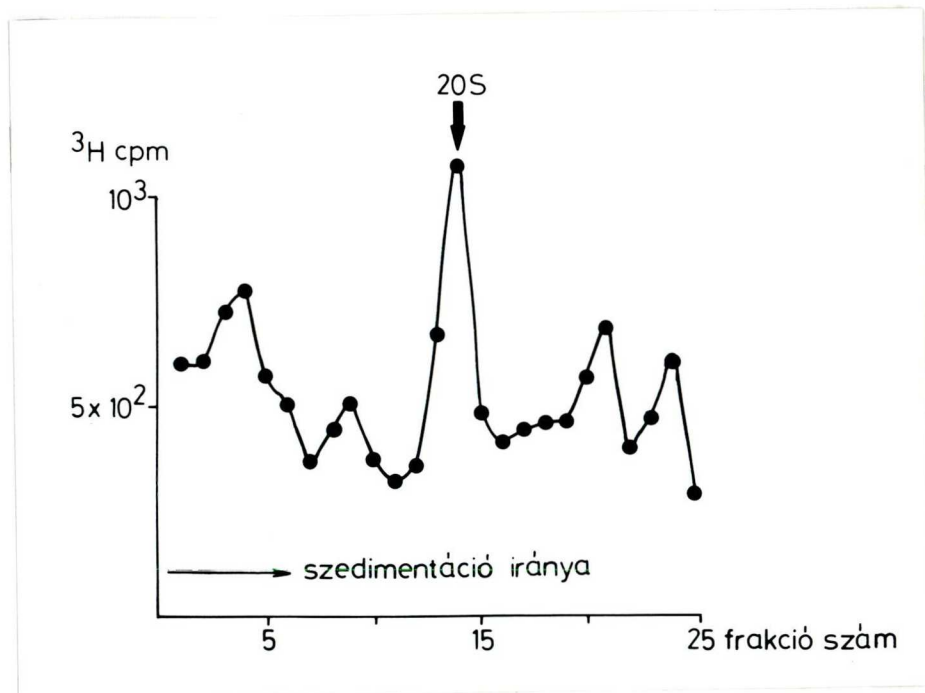
poli/A/ ⁻ hősokk HnRNS				
Hibr.felvitt		Izolált		%
cpm	µg	cpm	µg	
1.577.080	74,41	9.984	0,47	0,63

izolálására kidolgozott módszerünk jó, alkalmazható. Az aspecifikus hibridizáció kizárható a rendszerünk-ből.

Citoplazmatikus hősokk RNS-eket különböző mennyiségben /de mindig kevesebb, mint a telítési érték/ hibridizáltattuk a hősokk plazmidot tartalmazó filterhez. A hősokk mRNS-ek /a hibridizációkor felhasznált mennyiségtől függően/ 14,7-16,8%-a komplementer a 132E3S plazmiddal. Tehát a hősokk mRNS-ek átlagosan 15,4%-a kódolja a 70 000 D hsp-t. Citoplazmatikus poli/A/⁻ hősokk RNS-nek pedig kb. 10%-a hordoz a hősokk plazmiddal komplementer szekvenciát. Hősokk után a sejtmagban a poli/A/⁺ HnRNS-ek 1,23%-ban, a poli/A/⁻ osztály pedig 0,63%-ban tartalmaz 70 000 D hsp-t kódoló szekvenciát.

4.6. Az izolált 70 000 D molekulasúlyu hsp poli/A/⁺ pre-mRNS-ének jellemzése szedimentációja alapján

A plazmid DNS segítségével izolált hősokk HnRNS-t 5-20%-os szaharóz grádiensben ultracentrifugáltuk a már leírtak szerint. Azért, hogy megállapítsuk azt, hogy van-e az érett citoplazmatikus 20 S hősokk mRNS-nek a magban 20 S-nél nagyobb méretű prekurzora. A pre-mRNS szedimentációját a szaharóz grádiensben az alábbiakban mutatjuk be /14. ábra/ :



14. ábra

A hősokk plazmiddal komplementer sejtmagi poli/A/⁺ RNS szedimentációja 5-20%-os szaharóz grádiensben /SW-41-es rotor, 16 óra, 21 000 rpm, 20°C/

A pre-mRNS grádiensben való ülepedését a minták radioaktivitásának mérése alapján állapítottuk meg. Látható, hogy az aktivitások nagy része a 20 S zónában található. Tehát a 20 S hősokk RNS a sejtmagban is kimutatható. Az általunk alkalmazott módszer érzékenysége nem teszi lehetővé annak eldöntését, hogy nagyobb prekurzora is van-e a 20 S hősokk mRNS-nek /14. ábra/. A szedimentogramon a 20 S-nél nagyobb S zónákban viszonylag nagyobb mennyiségű /a minták radioaktivitása alapján/ 70 000 D hsp-t kódoló pre-mRNS ülepedett. Ennek magyarázata, hogy a pre-mRNS-t nem denaturáló körülmények között ultracentrifugáltuk, és valószínűleg aggregálódott a pre-mRNS.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. Specifikus nukleinsavak izolálása és dusicítása DNS-DBM filter hibridizációs technikával

Mivel napjainkban egyre nagyobb igényként jelentkező probléma, hogy nukleinsavakat - azok specifikus fajtaíait - könnyen és gyorsan izolálhassanak és detektálhassanak, munkánk céljául elsősorban e problémának a megoldását tüztük ki.

Kimutattuk, hogy a nukleinsavak immobilizálása DBM cellulóz filterre Alwine és munkatársai /1977/ módszere szerint alkalmas arra, hogy segítségével specifikus RNS-eket izolálhassunk és dusicithassunk fel. A diazotált cellulóz filter stabilan köti az egyes szálú nukleinsavakat, így lehetővé válik, hogy a hibrid plazmidok felhasználásával egy ismert fehérje szintéziséért felelős specifikus mRNS-t izoláljunk és felszaporítsunk. Különösen a HnRNS-ek esetében van ennek nagy jelentősége, mivel eddig nem állt a kutatók rendelkezésére egy olyan könnyen és rutinszerűen alkalmazható módszer, amelynek segítségével - a további vizsgálatokhoz elegendő mennyiségben - izolálhattak volna specifikus pre-mRNS-t.

Az általunk kidolgozott módszer segítségével rutinszerűen - a hibrid plazmidot többször felhasználva - lehet izolálni és felszaporítani specifikus pre-mRNS-t. A DBM-papír óriási előnye - az eddig alkalmazott nitrocellulóz filterekkel szemben -, hogy az RNS is stabilan ráköthető a filterekre. Ezért az mRNS-DBM-papír komplexet felhasználhatjuk a fehérjék térképezésére is. Izolálva egy specifikus mRNS-t, amelyről tudjuk, hogy melyik fehérje szintéziséért felelős, ezt rákötve a DBM-papírra, segítségével egy heterogén DNS populációból /amelyet restrikciós enzimekkel előzőleg megemésztettünk/ hibridizációs technika segítségével izolálhatjuk azt a DNS darabot, amelyről a specifikus mRNS transzkripciója történt. Ezt a DNS-t in situ hibridizáltatva a kromoszómákhoz megállapíthatjuk azt a kromoszóma régiót, amely az illető fehérje szintézisét kódolja.

Tehát megállapíthatjuk, hogy az általunk kidolgozott módszer segítségével izolálhatunk és feldúsíthatunk specifikus mRNS-eket, ha rendelkezésünkre áll az a hibrid plazmid, amely tartalmazza azt a DNS szekvenciát, amelyről a specifikus mRNS transzkripciója történik. Különösen pre-mRNS-ek vizsgálatánál van ennek nagy jelentősége, mert lehetővé válik a pósztranszkripciós szabályozás mechanizmusának a vizsgálata, amely magában foglalja a primér transzkriptum szintézisétől az érett mRNS citoplazmába való kijutásáig végbemenő összes változást. Így lehetővé válik a 3'

és 5' végi modifikációnak, a degradációnak, a splicing-nek a vizsgálata.

Ezen változások megismerésével többet tudunk azokról a folyamatokról, amelyek a magban lejátszódnak, a transzkripciótól az érett mRNS-nek a citoplazmába való kijutásáig.

5.2. A 70 000 D hsp-t kódoló szekvenciák megoszlása a poli/A/⁺ és poli/A/⁻ citoplazmatikus és sejtmagi RNS osztályokban

Specifikus mRNS izolálásán kívül, ebből a munkánkból választ szeretnénk volna kapni arra, hogy a citoplazmatikus mRNS-eknek hány százaléka a 70 000 D molekulasúlyú fehérjét kódoló mRNS. Ez a százalék a következőképpen oszlik meg a poli/A/⁺ és a poli/A/⁻ mRNS-ek között a citoplazmában :

a poli/A/⁺ mRNS-ek 15,4 %-a

a poli/A/⁻ mRNS-ek 10,24%-a

kódolja a 70 000 D molekulasúlyú fehérjét.

Ugyanez a százalék a pre-mRNS-ek esetében így alakul :

a poli/A/⁺ pre-mRNS-eknek 1,23%-a

a poli/A/⁻ pre-mRNS-eknek 0,63%-a

tartalmaz 70 000 D hsp-t kódoló szekvenciát.

Ha összehasonlítjuk a citoplazmatikus mRNS-ekre és a pre-mRNS-ekre kapott százalékot, azt a következtetést vonhatjuk le, hogy hő sok hatására nemcsak a hő sok gének aktiválódnak, hanem egy szelektív nukleo-citoplazmatikus transzportnak kell beindulnia, ami bizto-

sitja az egyéb mRNS-ek degradációján kívül a hősokk mRNS-ek felhalmozódását a citoplazmában.

Választ szeretttünk volna kapni arra is, hogy van-e 20 S-nél nagyobb méretű prekuzora a magban a hősokk mRNS-nek, amelyik a 70 000 D molekulasúlyú fehérje szintézisét irányítja. Az izolált pre-mRNS szedimentogramja alapján /14. ábra/ azt mondhatjuk, hogy /a mi kísérleti metodikánkkal/ 20 S-nél nagyobb prekuzor a magban nincs. A 20 S-nél nagyobb S értékeknél valószínűleg aggregátumok ülepedtek, mivel nem denaturáló körülmények között végeztük az ultracentrifugálást. Valószínű, hogy ha van is 20 S-nél nagyobb prekuzor, az igen kis mennyiségben lehet jelen és nagyon gyors lehet turnover-ük.

6. IRODALOMJEGYZÉK

- Alwine, J.C., Kemp., P.J., Stark, G.R. 1977.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350-5354.
- Ashburner, M. 1970. Chromosoma 31, 356-376.
- Ashburner, M., Joze, I., Bonner, 1979. Cell
Vol. 17, 241-254.
- Berendes, H.D., Holt, Th.K.H. 1964. Genen. Phaenen.
9, 1-7.
- Berendes, H.D., van Breugel, F.M., Holt, Th.K.H.
1965. Chromosoma 16, 35-46.
- Craig, E.A., McCarthy, B.I., Wadsworth, S.C. 1979.
Cell 16, 575-588.
- Denhardt, D. 1966. Biochem. Biophys. Res. Commun.
23, 641-652.
- Echalier, G., Ohanessian, A. 1969. C. R. Acad. Sci.
268, 1771.
- Echalier, G., Ohanessian, A. 1970. In vitro 6, 162.
- Ellgaard, E.G. 1972. Chromosoma 37, 417-422.
- Haines, M.E., Carey, N.H., Palmiter, R.D. 1974.
Eur. J. Biochem. 43, 549.

Henikoff, S., Meselson, M. 1977. Cell 12, 441-451.

Laemmli, U.K. 1970. Nature 227, 680-685.

Lengyel, I.A., Pardue, M.L. 1975. J. Cell Biol. 67,
240a.

Lengyel, I.A., Penman, S. 1975. Cell 5, 281-290.

Lewis, M., Helmsing, P.I., Ashburner, M. 1975.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3604-3608.

Levis, R., Penman, S. 1977. Cell 11, 105-113.

Lis, I., Prestidge, L., Hogness, D.S. 1978. Cell
14, 901-919.

Livak, K.F., Freund, R., Schwber, M., Wensink, P.C.,
Meselson, M. 1978. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
in press.

McCarthy, B.I., Compton, J.L., Craig, E.A.,
Wadsworth, S.C. Tenth Miami Winter Symposium
/New York/ Academic Press, pp. 317-333. 1978.

McKenzie, S.L., Henikoff, S., Meselson, M. 1975.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1117-1121.

McKenzie, S.L., Meselson, M. 1977. J. Mol. Biol.
117, 279-283.

Plagens, U., Greenleaf, A.L., Bautz, E.K.F. 1976.
Chromosoma 59, 157-165.

Ritossa, F. 1962. *Experientia* 18, 571-573.

Rubin, G.M., Hogness, D.S. 1975. *Cell* 6, 207-213.

Schedl, P., Artavanis-Tsakonas, S., Steward, R.,
Gehring, W.J., Mirault, M.E., Goldschmidt-Clermont, M.,
Moran, L., Tissières, A. 1978. *Cell* 14, 921-929.

Schneider, M. 1964. *J. Exp. Zool.* 156, 91-104.

Silver, L.M., Elgin, S.C.R. 1977. *Cell* 11, 971-983.

Sondermeijer, P.I.A., Lubren, N.H. 1978. *Eur. J.
Biochem.* 88, 331-339.

Spradling, A., Penman, S., Pardue, M.L. 1975. *Cell*
4, 395-404.

Spradling, A., Hui, H., Penman, S. 1975. *Cell* 4,
131-137.

Spradling, A., Pardue, M.L., Penman, S. 1977. *J. Mol.
Biol.* 109, 559-587.

Tissières, A., Mitchell, H.K., Tracy, U.M. 1974.
J. Mol. Biol. 84, 389-398.

Varick, N.L., Luhachevick, I.S., Kaverin, N.V. 1976.
J. Virol. 18, 111-116.

