

REKOMBINÁCIÓS VIZSGÁLATOK EGY MÉRSÉKELT
BAKTERIOFÁG KROMOSZÓMÁN

Írta: PALÁGYI ZSUZSANNA

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Készült a József Attila Tudományegyetem
Genetika Tanszékén

Szeged, 1986



TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
II.1.	A rekombináció szerepe az élővilágban	3
II.2.	A legjobban ismert prokariota rekombinációs rendszerek	5
II.2.A)	A rekombináció molekuláris modellje Dressler és Potter után Escherichia coliban	6
II.2.B)	A λ fág rekombinációs rendszere	11
II.2.C)	A T4 fág és rekombinációja	19
II.2.D)	A Rhizobium meliloti 16-3 fágjáról	27
III.	CÉLKITŰZÉS	30
IV.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	31
IV.1.	Táptalajok, antibiotikumok, aminosavak, baktérium és fág törzsek, plazmidok	31
IV.1.A)	Táptalajok	31
IV.1.B)	A táptalajokba adott antibiotikumok és aminosavak	31
IV.1.C)	Baktériumtörzsek	32
IV.1.D)	Plazmidok	33
IV.1.E)	Fágtörzsek	34
IV.2.	Klasszikus mikrobiális módszerek	35
IV.3.	Biokémiai módszerek	40
IV.4.	Rövidítések jegyzéke	47

V.	KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK	49
V.1.	Többfaktoros keresztezésekhez szükséges tesztelő fág törzsek előállítása	49
V.2.	Hárompontos fág keresztezések	52
V.3.	Négypontos keresztezések	59
V.4.	Marker rescue kísérletek	69
V.5.	Megjegyzések	82
VI.	AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	83
VII.	IRODALOMJEGYZÉK	86

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Egyetemi doktori értekezésemet a JATE Genetikai Tanszékén készítettem. Köszönettel tartozom dr. Orosz László tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy lehetőséget adott a dolgozat elkészüléséhez, munkámat mindvégig figyelemmel kísérte, irányította és rossz napjaimon buzdított.

Hálás vagyok munkatársaimnak, akik ötleteikkel, hasznos tanácsaikkal elősegítették munkámat. Közülük is külön köszönöm hozzám való jóságát Olasz Ferencnek és Dorgai Lászlónak, akikhez mindig bizalommal fordulhattam problémáimmal, s akik nemcsak folyamatosan figyelték és segítettek tevékenységemet, de az eredményeimnek is mindenkor lelkes hirdetői voltak, s velem örültek. Garamszegi Nándorra technikai nehézségeim elhárításában mindig számíthattam, köszönet érte!

A kísérletek kivitelezésében dr. Horváth Péterné és Zsótér Erzsébet voltak segítségemre. Szolgálatkész, pontos munkájukat ezúton is köszönöm.

Az ábrák szép kivitelezéséért Puskás Zsuzsának és Siroki Olgának, a dolgozat végső formába öntéséért ismételen Puskás Zsuzsának szeretném ezúton is köszönetemet kifejezni.

I. BEVEZETÉS

Munkacsoportunk - s így én is - a *Rhizobium meliloti* 41 elnevezésű baktériummal és ennek 16-3 fágjával foglalkozik. A RM 41 gram negatív baktérium, amely a légköri N_2 megkötésére képes, s ezt a vele szimbiózisban élő pillangósvirágú növény számára felvehető tápanyaggá - NH_3 -vá - alakítja. Szimbiotikus nitrogénkötésre úgynevezett alfalfa gazdanövényekkel: *Medicago sativaval* (takarmány lucerna), illetve a *Melilotus* (Somkóró) és a *Trigonella* (Lepkeszeg) genus 1-2 fájával képes. Noha gazdanövényeit nem egyetlen faj egyedei jelentik, mégis szűk gazdaspecifitású.

A mai - világszerte nehéz - gazdasági viszonyok között különösen érdekessé, értékké vált ennek, illetve a hozzá hasonló organizmusoknak a vizsgálata, ugyanis a baktérium gazdaspecifitásának kiterjesztésével csökkenthető lenne a nitrogéntartalmú műtrágyák költséges előállítása. Nem is szólva arról, hogy a kultúrnövények ilyen módon történő nitrogén ellátása messzemenően kíméli a civilizációs ártalmaktól szenvedő környezetünket. Az RM 41 baktérium 16-3 fágja, mint a nitrogénkötésért felelős gének, vagy a baktérium gazdaspecifitását befolyásoló allélek hordozó vek-

tora játszhatna fontos szerepet az említett gazdasági probléma megoldásában.

Alapkutatási szempontból is jelentős a *Rhizobium meliloti* 41 és 16-3 jelű mérsékelt fágjának tanulmányozása. A baktérium - bakteriofág rendszerek ugyanis aránylag egyszerűek, jobban kezelhetők a magasabbrendű élőlényekhez képest, és így könnyebben, részletesebben tanulmányozhatók. Sok - az élővilágban alapvető fontosságú - folyamat akár molekuláris szinten is kényelmesen vizsgálható bennük. Tudományágunkban ilyenek: az örökítő anyagnak, a DNS-nek a szerveződése, átrendeződései, a rekombináció mechanizmusa, az egyes gének kifejeződése, expressziója, illetve ennek szabályozása stb. A vizsgálati eredmények kiválóan összehasonlíthatók más hasonló procariota rendszerekben kapott eredményekkel. Esetünkben az RM 41-gyel és 16-3 fágjával végzett kísérleteink eredményei a már nagyon jól ismert *Escherichia coli* és λ fágja rendszerben tapasztaltakkal. Sok több oldalú, minden lényeges momentumra kiterjedő összehasonlítás szükséges ahhoz, hogy egy-egy élőlénycsoportra, majd sok ilyen ismeret felhalmozása és rendszerezése után az egész élő természetre érvényes törvényszerűségek levonhatók legyenek.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A rekombináció szerepe az élővilágban

A genetikai rekombináció az élővilágban mindenütt előforduló általános jelenség: a legegyszerűbb prokariotáktól kezdve a legmagasabbrendű eukariotákkal, illetve az emberrel bezárólag, mindenféle élőlényben találkozhatunk vele.

Ha ennek a jelenségnek a széleskörű elterjedtsége mellett a fontosságát is szemléltetni akarjuk, akkor a következőket mondhatjuk. A genetikai átrendeződésnek a következménye új, a szülőitől eltérő genotípusú sejtek létrejötte lehet, s ha a rekombináció ivarsejtek képződése közben lép fel (egysejtűeknél sejtosztódás, illetve konjugáció során), akkor az ezekből létrejövő új egyedek úgynevezett rekombináns egyedek lesznek. Az új tulajdonságok egy adott környezetben, vagy éppen egy környezetváltozás során kedvezőbbek lehetnek a szülői tulajdonságoknál, s az ezekkel rendelkező egyedek előnyös helyzetben lesznek a változatlan genotípusúakkal szemben. Például: ellenállóbbak lesznek valamilyen kedvezőtlen behatással (betegség, kedvezőtlen hőmérséklet stb.) szemben. A rekombináció emellett még színesebbé, változatosabbá tehetné, teheti az öröklé-

hető új tulajdonságok skáláját. A molekuláris őslénytannal foglalkozó kutatók a különböző fehérjék vizsgálataiból származó, eddig felhalmozódott eredmények alapján valószínűnek tartják, hogy a fehérjék nagy többsége nagyon is kis számú archeotípusból (ősmintából) alakult ki. A fehérje-evolúció egyik fontos mechanizmusa a gén megkettőződés, a duplikáció. Fontos szerepe volt és van tehát a rekombinációnak a fajok fejlődésében, az evolúcióban.

E mellett bizonyos élőlényeknek a normális életciklusuk lezajlásához is elengedhetetlen a rekombináció létrejötte. A mérsékelt bakteriofágok vagy a genomba beépülő állati vírusok például ilyen módon épülhetnek be a baktérium, illetve az állat kromoszómájába, és megfelelő számú szaporodási ciklus lezajlása után hasonlóképpen rekombinációs folyamat(ok) segítségével vágódhatnak, szabadulhatnak ki onnét.

Említést tesznek még arról is, hogy nagyon sok szakember dolgozik napjainkban is az alkalmazott biológia több különböző területén, ahol "eszközül" használják a rekombináció jelenségét. Sok növény- és állatnemesítő végez különféle keresztezéseket, amelyekből a legkedvezőbb tulajdonságú utódokat válogatják ki továbbtenyésztésre (termesztésre), vagy például egy hibrid létrehozására szülőknek. Nem is szólva arról, hogy ma már a szövettenyésztési eljárások fejlődésével pl: termesztett növényeinknek bi-

zonyos fajtáit ilyen feltételek mellett létrehozott és kiválogatott rekombináns egyedek szaporításával állítják elő, illetve a nagyüzemi termesztéshez szükséges szaporítóanyag egy részét is így termelik meg. Beszélhetnék még hosszasan a genetikai átrendeződés szerepéről az iparban használatos baktérium és gomba fajoknak az egyre jobban termelő, könnyebben kezelhető, tisztább hatóanyagot vagy új terméket előállító fajtáinak létrehozásában, törzseinek fejlesztésében, de mivel jelenlegi dolgozatomnak nem ez a feladata, nem teszem.

Ellenben engedtettsék meg, hogy az utolsó mondatban dióhéjban szóljak csoportunk által is művelt tudományágban betöltött szerepéről a rekombinációs folyamatoknak. A rekombináció nemcsak tárgya a genetikai kutatásoknak, de ez a jelenség kiváló alapja is a genetikai analízisek legtöbbszörének.

II.2. A legjobban ismert prokariota rekombinációs rendszerek

Az előző alfejezetben láthattuk, hogy a DNS rekombinációja igen széles körben előforduló nagy fontosságú jelenség az élővilágban. Ez magyarázza, hogy amióta felfedezték, maga a jelenség is mélyreható kutatások tárgya lett. Milyen körülmények között, hol, hogyan, milyen más molekulák közreműködésével zajlik le? Ezekre a kérdésekre keresnek vá-

laszt a kutatások, s noha már több rendszerben sok részlet világossá vált, s valamennyire körvonalazható ez a meglehetősen összetett, bonyolult jelenség, mégis van még bőven válaszra váró kérdés, és bővebb kísérleti alátámasztásra váró elmélet. Legjobban az *Escherichia coli* enterobaktériumban, és ennek fágjaiban - ezek közül is leginkább a λ -ban - ismert a jelenség. Ezért a továbbiakban röviden ezekkel szeretnék foglalkozni írásomban.

II.2.A) A rekombináció molekuláris modellje Dressler és Potter után *Escherichia coliban*

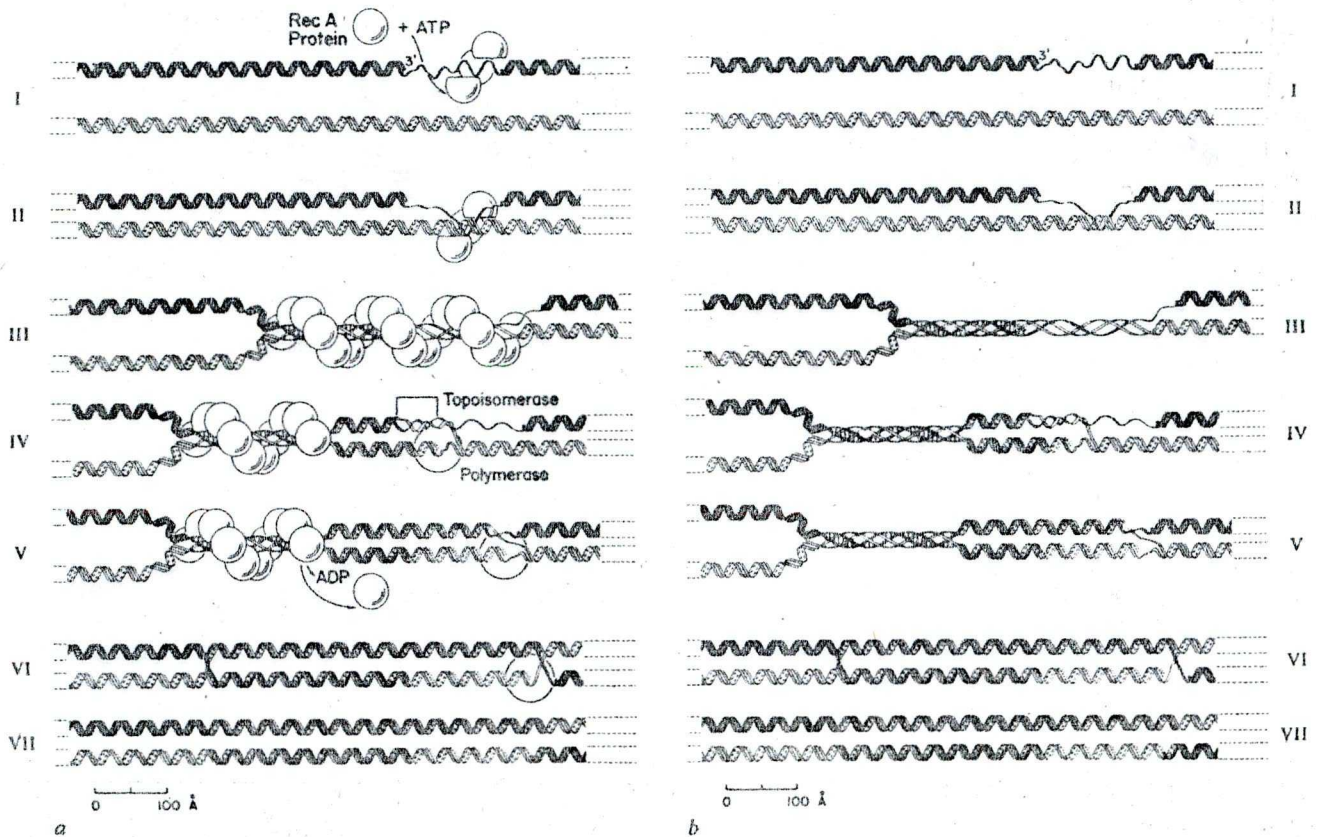
Az már nyilvánvaló, hogy a Holliday-féle DNS struktúra - amelyek fizikai létét elektromikroszkóp megfigyelésekkel a fent említett két szerző igazolta először 1976-ban - kapcsolatban van a rekombinációval, sőt annak egy központi köztes terméke. E rekombinációs intermediérből azután a Sigal-Alberts-féle izomerizáció segítségével, s a kereszthíd megoldódásával rekombináns DNS termék jöhet létre. A Holliday-struktúra kereszthídjának kicsi a térigénye, és kis energia befektetésével mozoghat a DNS szálak mentén. Így heteroduplex DNS szakaszok jöhetnek létre, és ilyen módon a Holliday intermediének a keletkezési helyétől távol is lehetséges a megoldódása. Hogy milyen folyamatok és hogyan vezetnek a Holliday-struktúra

kialakulásához, arra ma még nincs elég kísérleti bizonyítékunk, de többféle elméleti modell ismeretes. Ezeknek a részletezésétől jelen értekezésemben eltekintek. Jó összefoglalást adott ezekről magyar nyelven egyik volt munkatársnóm, Páy Anikó 1984-ben írt egyetemi doktori értekezésében.

Lássuk inkább az *E. coli* rekombinációjára kidolgozott modellt! Ez az eddigi kutatások eredményeit kísérli meg összefoglalni, s ezek elemzéséből, ötvözéséből egy lehetséges utat ajánl arra vonatkozólag, hogy a rekombináció lépései hogyan, milyen sorrendben, milyen géntermékek részvételével mehetnek végbe (Dressler és Potter, 1982).

A modell útmutatása szerint a folyamat az *E. coli* rec B és rec C génjeinek transzlációjával kezdődik. A kétféle géntermék összekapcsolódásával megtermelődik a több alegységből álló rec BC enzim, amely a DNS duplexhez kapcsolódva, illetve a kettős spirál egyik szálán haladva (a másikat helyileg letekerve) néhány száz bázispárra kiterjedő denaturációt hoz létre. Az elkülönített szálakat egy egyszálú DNS-kötő fehérje vagy majd maga a rec A stabilizálja. Az így létrejött DNS molekula fog a rekombináció során donorként viselkedni, úgy, hogy az elkülönített szálak egyike "megtámadja" a másik - homológ - DNS molekulát. A rec A fehérje segítségével keresi meg a "támadó" szál - miután komplexet képzett a rec A-val - a másik DNS-ben a komplementer szakaszát (legalább 30 bp-nyi hosszúságú kell legyen).

A rec A protein több helyen részlegesen denaturálja a recipiens DNS-t ATP energia hozzájárulásával, hogy a támadó szál a vele komplementer recipiens DNS szálal találkozhasson, és vele hidrogénhídkötéseket képezhessen. Ez a kapcsolat csak kis számú hidrogénhídra korlátozódik kezdetben, mindnaddig míg valamelyik DNS molekulában nem lesz szabad vég. Ellenkező esetben a két DNS molekula nem képes tökéletes kettős spirált létrehozni. A nyitó-záró enzim ezt felsimerve egy átmeneti behasítással lehetővé teszi a két szál megfelelő feltekeredését. S ezzel a Holliday szerkezethez hasonló rekombinációs intermediér struktúra jön létre, és a folyamat befejezéséhez már csak a két rekombinálódó DNS molekula szétválása hiányzik. A szétválasztás enzimatisz úton történhet. Ismerünk olyan enzimeket, amelyek képesek a Holliday kereszthíd hasítására. Ilyenek a T4 endonukleáz VII-génje vagy az int gén terméke a λ -ban, amely az att helynél oldja meg specifikusan a szerkezetet. Végül a DNS ligáz a törések újraegyesítését végzi, helyreállítja az intakt kettős spirálokat. Tekintsük az 1. ábrát!



1. ábra. Howard-Flanders-féle rekombinációs modell: két kettős spirál között a szálak reciprok kicserélődése (Howard-Flanders és mtsai, 1984).

a) A teljes modell enzimekkel.

b) Ugyanaz enzimek nélkül.

- I. A Rec A fehérje iniciációs komplexet képez az egyik kettős spirál egyes szálával.
- II. A fenti komplex az intakt duplexhez kapcsolódik, ez az átmeneti kapcsolódás addig tart, míg az egyes szál a duplexben "megtalálja" a homológját.
- III. Ezután a DNS szálak párt képeznek, s az iniciációs komplex további kapcsolódás magvaként működik. Mennél több Rec A fehérje kötődik a DNS-hez, annál nagyobb területen tartja össze az általa létrehozott spirális fonál a két DNS molekulát.
- IV. A fehérje spirál a Rec A monomerek hozzákapcsolódásával a "feji" végénél nő, míg a "farki" végénél a monomerek fokozatosan válnak le a DNS-ről miután a heteroduplex létrejött. A felső heteroduplexet topoizomerase relaxálja, a DNS polimeráz pedig megkezdheti a rés feltöltését nukleotidokkal annak 3' végétől kezdve.



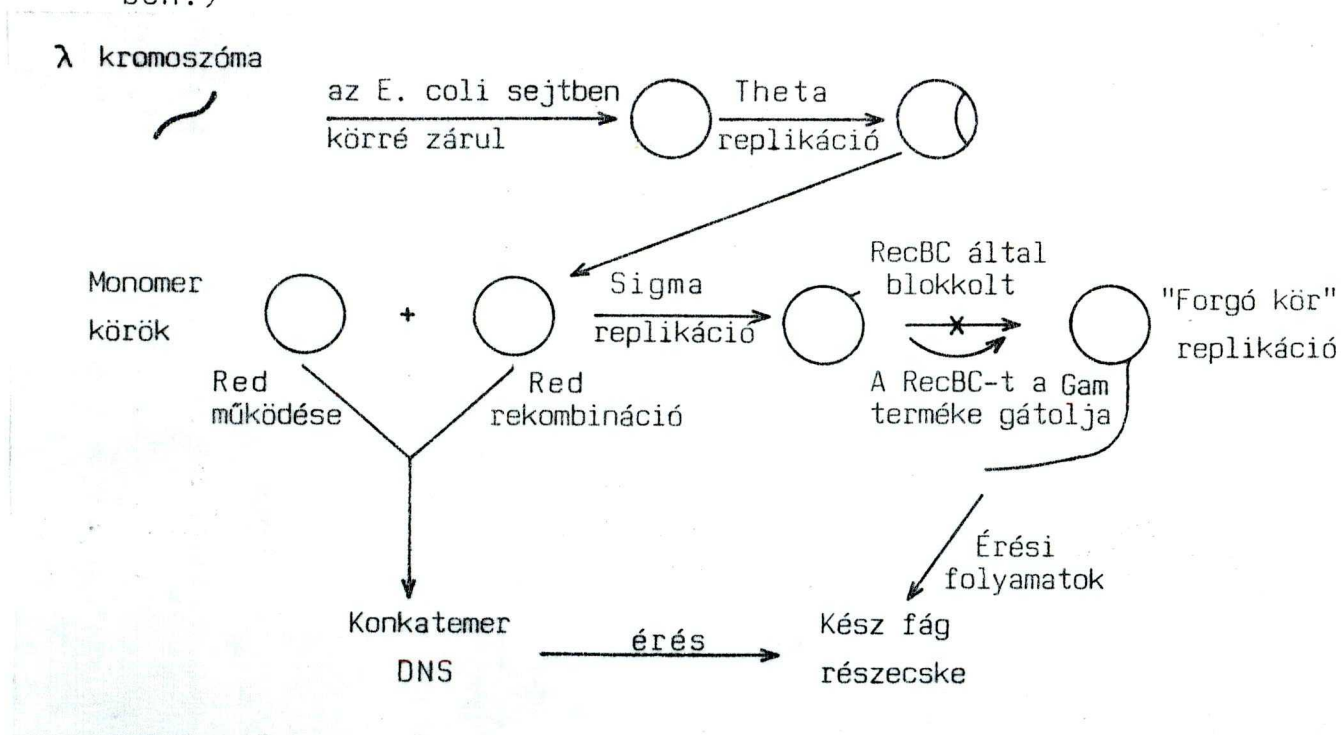
- V. A Rec A segítségével létrejött keresztkötés ATP hidrolíziséből származó energiát használ fel a további vándorláshoz.
- VI. Az utolsó Rec A monomer is ledisszociál, egyszálú keresztkötést hagyva maga után, amelynek megoldása transzhasító endonukleázokkal történhet.
- VII. A heteroduplex régióban megtörténik a kettős spirálok regenerálása DNS polimeráz, illetve ligáz enzimek segítségével, és befejeződik a rekombináció.

A vázolt modell a lehetséges utak közül egy útját választotta ki a rekombinációnak. Ezen kívül még más módokon is végbemehet rekombináció az *E. coliban*. Ilyenek: a Rec E, Rec A - Rec F, Rec A - sbc - Rec BC utak, de ezek az utak a vad típusú organizmusban alárendelt szerepet játszanak.

A rekombináció gyakran szoros összefüggésben van különböző repair folyamatokkal is. Ez utóbbiakkal, illetve a kétféle folyamatok összefüggéseivel sem foglalkozom ebben a munkában szerteágazóságuk, összetett, bonyolult voltuk miatt. Részletesen foglalkozott ezzel a témakörrel közvetlen munkatársam, Olasz Ferenc 1983-ban írt egyetemi doktori disszertációjában.

II.2.B) A λ fág rekombinációs rendszere

A II.1. alfejezetben már említettem, hogy a mérsékelt bakteriofágok esetében a rekombináció a fág lizogén szaporodásának elengedhetetlen feltétele, és szorosan összefügg a kromoszómaciklusával. Nézzük tehát először - a jobb érthetőség céljából - a λ kromoszómaciklusát (2. ábra). (A téma részletezését lásd Lambda II., 1983 könyv "Lambda DNA replication" és "DNA packaging and cutting" fejezetében.)



2. ábra. Replikáció és rekombináció a λ fág kromoszómaciklusában

A virionban a λ kromoszómája egy $5 \cdot 10^4$ bázispárból álló Watson-Crick duplex. Mindkét lánc 3' OH végéről hiányzik 12 nukleotid, s az így kialakult 5' OH két egyszálú vég komplementere egymásnak (ragadós végek). Ha a fág bejut a gazdasejtjébe az *Escherichia coli*-ba, akkor az a bakteriofág-kromoszóma a túlnyúló 5' végei segítségével körre zárul, majd ligáz működés következtében kovalensen zárt molekula képződik. Amennyiben a fág a lizogén szaporodás útját választja, a bakteriális, illetve a fág att helynél történő helyspecifikus rekombináció által a λ fág kromoszómája beépül az *E. coli* kromoszómájába, s egy ideig azal együtt replikálódik. Ha kiszabadul (kivágódik) onnan, vagy eleve a litikus úton szaporodik, akkor azonnal elkezdődik a fág-kromoszóma replikációja, s a capsidfehérjéket kódoló gének megnyilvánulása révén megszintetizálódnak a burokfehérjék. A bakteriofág O és P génjeinek terméke *E. coli* proteinekkel együttműködve jutnak szerephez a köralakú λ kromoszóma replikálásában. A replikáció előbb ún. theta alakban történik, amely létrehoz egy kisebb fág-kromoszóma populációt, majd átvált szigma replikációba, amelyben a körök némelyike ún. "rolling circle"-lé alakul át a λ red és gam génjei segítségével. A replikációs enzimek folyamatos működése a "forgó kör" replikációs villájából kiindulva egy "farkat" hoz létre a körön. Az egyedi λ kromoszómák e szerkezet kinyúló "farokrészből" vágódnak le és pakolódnak. A pakolási rendszer csak

a λ -nál nagyobb egységek (ún. konkatemerek) részeként csomagolja a kromoszómákat, s a ragadós végnél szekvencia-specifikusan vágja méretre.

A fágkeresztezésben végbemenő rekombináció(k)nak - figyelembe véve a Visconti és Delbrück (Visconti, Delbrück, 1953) által kidolgozott rekombinációelméletben szereplő többszörös szabad párképzés lehetőségének biztosítását - a kromoszóma gazdasejtbe való bejutása és a "forgó kör" szerkezet kialakulása között kell lezajlania(uk).

Lássuk, milyen rekombinációs rendszerek működnek - működhetnek közre a λ kromoszóma kicserélődésében. (Összefoglaló található e témáról a Lambda II.: "General recombination" és a "Site-specific recombination in phage Lambda" című fejezetében.)

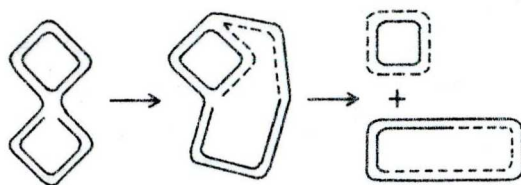
A λ -n főként három, egymással többé-kevésbé összefüggő rekombinációs rendszer hoz létre rekombinációt. Ebből a Rec rendszer a gazdabaktérium, az E. coli rendszere, amelyről az előző alfejezetben már említést tettem, így itt már nem részletezem.

A fennmaradó további két rekombinációs rendszer a fágnek a saját rendszere. Elsőként a Red rendszert vegyük kicsit szemügyre. A Red rendszer önmagában - a Rec rendszer közreműködése nélkül - is képes érett fágokat lét-

rehozni, de sokkal kevesebbet, mint rec A^+ működés jelenlétében. Az előzőekben már volt róla szó, hogy a Red rendszer működése elengedhetetlenül szükséges a λ replikációban az ún. "forgó kör" kialakulásához. S ennek a működésnek a következtében, illetve mert a λ fág pakoló apparátusa konkatemer szubsztrátot igényel, a λ kromoszóma pakolása, csomagolása sem független a Red rendszertől. A kísérleti eredményekből úgy látszik, a teljes hatásfokú Red működés vagy a Rec rendszer működését vagy folyamatban levő replikációt igényel (Stahl, F.W. és Stahl, M.M., 1974; illetve Whitehouse, H.L.K.: "Genetic recombination" című könyve, 1982). A Red rendszer a λ fág nagy általános rekombinációs rendszere. Ha a λ -t olyan E. coli gazdasejtekben növesztik, amely - különböző módokon - hiánymutáns a rekombinációs működésben, akkor a fág Red rendszere biztosítja a rekombinások csaknem normális gyakoriságát az utód fágreszecskek között. A baktérium Rec rendszere és bakteriofágjának Red rendszere több ponton is összefüggést mutat. Egy példa erre a Red és a gam szerepe a konkatemer DNS létrehozásában, a gam géntermék Rec BC működését gátló hatása a "forgó kör" replikáció kialakításában. A két rendszer - a Rec és Red - működése között egyébként is több figyelemreméltó hasonlóság fedezhető fel. Az egyik hasonlóság ezek közül, hogy a két rendszer működése esetén az egyiknél és a másikonál is a keletkező kettős rekombinások átlagos

populáció nagysága az egyes rekombinánsokénak kb. a fele. Ez az eredmény nemcsak a két rendszer egy közös oldalát mutatja, hanem összefüggésben van a fág rekombinációs elméletben tárgyalt "mating" elmélettel is (Visconti és Delbrück, 1953). Találunk egy másik hasonlóságot is Rec, illetve a Red által közvetített rekombinációkban, amely a fág kromoszómán történő DNS kicserélődés helyi megoszlásában van. Ha egy fág egy bizonyos kromoszómaszakaszon - távolságon - rekombinál, annak a gyakorisága, hogy egy hozzá közeli intervallumban szintén rekombinál, egyenlő a két rendszer esetében. Megjegyzendő, hogy itt viszonylagos gyakoriságról van szó, amely a két rendszerre hasonló, ugyanis a rekombináció frekvenciája a Red esetén általában háromszor nagyobb, mint Rec esetén. A Red rendszer nagyobb aktivitása magyarázható azzal, hogy a Red elősegíti a fág-kromoszómák közötti párképzést, tudniillik azt, hogy egy adott fágkromoszóma többször képezzen párt más fágkromoszómákkal. A tárgyalt hasonlóságok alapján Stahl-ék a két rendszer rekombinációjának molekuláris mechanizmusára is hasonló - nyolcas alakú dimer molekulát tartalmazó - modellt ajánlanak. A hasonlóságok tárgyalása során is előkerült már egy különbség is a két rendszer között, további különbség még, hogy a Rec rendszer rekombinációja reciprok folyamat, míg a Red által létrehozott rekombinációk a "Single burst" vizsgálatok utódainak megoszlása alapján nem látsza-

nak reciprok folyamatnak (3. ábra).



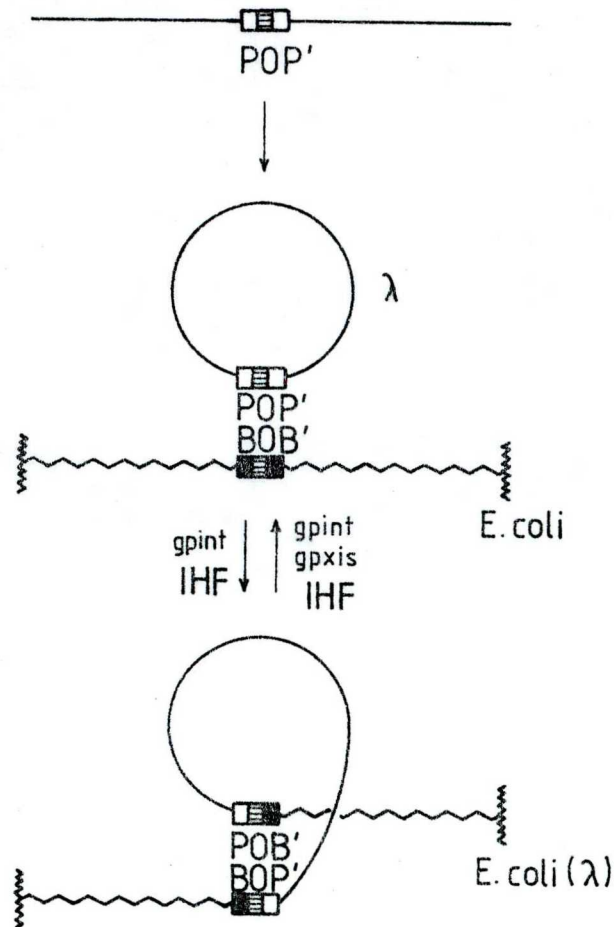
3. ábra. Modell a Red, valamint a Red+Rec rendszerre (Stahl, 1979)

A Red rendszerre leírt rekombinációs modell nyolcas alakú dimer intermediert ajánl. A nyolcas alakzat egyik hurkát nukleáz 5' részlegesen elhasítja. Az ábra érzékelteti, hogy a folyamat általában nem reciprok. (Stahl álláspontjával ellentétes nézetekkel is találkozhatunk az irodalomban.)

Noha mindkét rendszer működésére sok kísérleti eredmény áll már rendelkezésre, mégis részletek ismereteseink inkább, s az egész folyamatra vonatkozó egységes elképzelés csak nehezen alakul. Ami abból is adódik, hogy a rekombináció egyetlen olyan kis méretű organizmuson is, mint a λ fág több alternatív úton végbemehet, s az egyes utakat nem könnyű külön-külön vizsgálni.

A λ helyspecifikus rekombinációjáról, az Int rendszer működéséről eddig még nem ejtettünk szót. Tekintsük át ezt is vázlatosan! (Jó összefoglalót találunk erről a Lambda II. könyv "Site-specific recombination in phage " fejezetében.)

A λ fág Int rendszere a bakteriofág kromoszómának integrálódásáért felelős az *E. coli* kromoszómájába. A beépülés - mint már a helyspecifikus kifejezés utalt rá - a kromoszómák meghatározott helyei, a fág att P és a baktérium att B közötti rekombináció útján megy végbe. A folyamat-hoz a gazdasejt IHF fehérjéje is szükséges (Weisberg és Landy, 1983; Campbell, 1962). A profág kivágódása hasonló folyamat által történik, ehhez a fordított folyamathoz a λ xis fehérjéje, valamint gpint és a baktérium IHF proteinje is szükségeltetik, amely elősegíti a reciprok egy-szálú kicserélődést a két specifikus helyen, az att P és att B core régióján belül. Lásd a 4. ábrát! Az ábrán, amely Campbell nyomán készült, a λ helyspecifikus rekombináció-ját láthatjuk a lehető legegyszerűbb ábrázolásmódban. A folyamat ATP-t igényel és azt, hogy a kromoszómák nick-mentesek legyenek, ugyanis lényeges, hogy ezek szupertekercselt (supercoiled) állapotba kerülhessenek DNS gyráz működés segítségével. Találhatók a λ és az *E. coli* kromoszómán is másodlagos att helyek. Az Int rendszer ezek között is képes rekombinációt létrehozni, de ilyen esetekben a reakció sokkal kevésbé hatékony, mint az elsődleges att helyek között. (A λ kromoszóma beépülése az *E. coli* kromoszóma att B helyére kb. 1000-szer hatékonyabb, mint a legjobb másodlagos att helyre.) Kísérletekkel bizonyították (Shulman és Gottesman, 1977), hogy az Int re-



4. ábra. A λ fág beépülésének és a profág kivágódásának modellje - Campbell után.

A fág attachment helyét az ábra POP'-vel, a baktériumét BOB'-vel jelöli. Ezekon belül a O a crossing over régiót szimbolizálja.

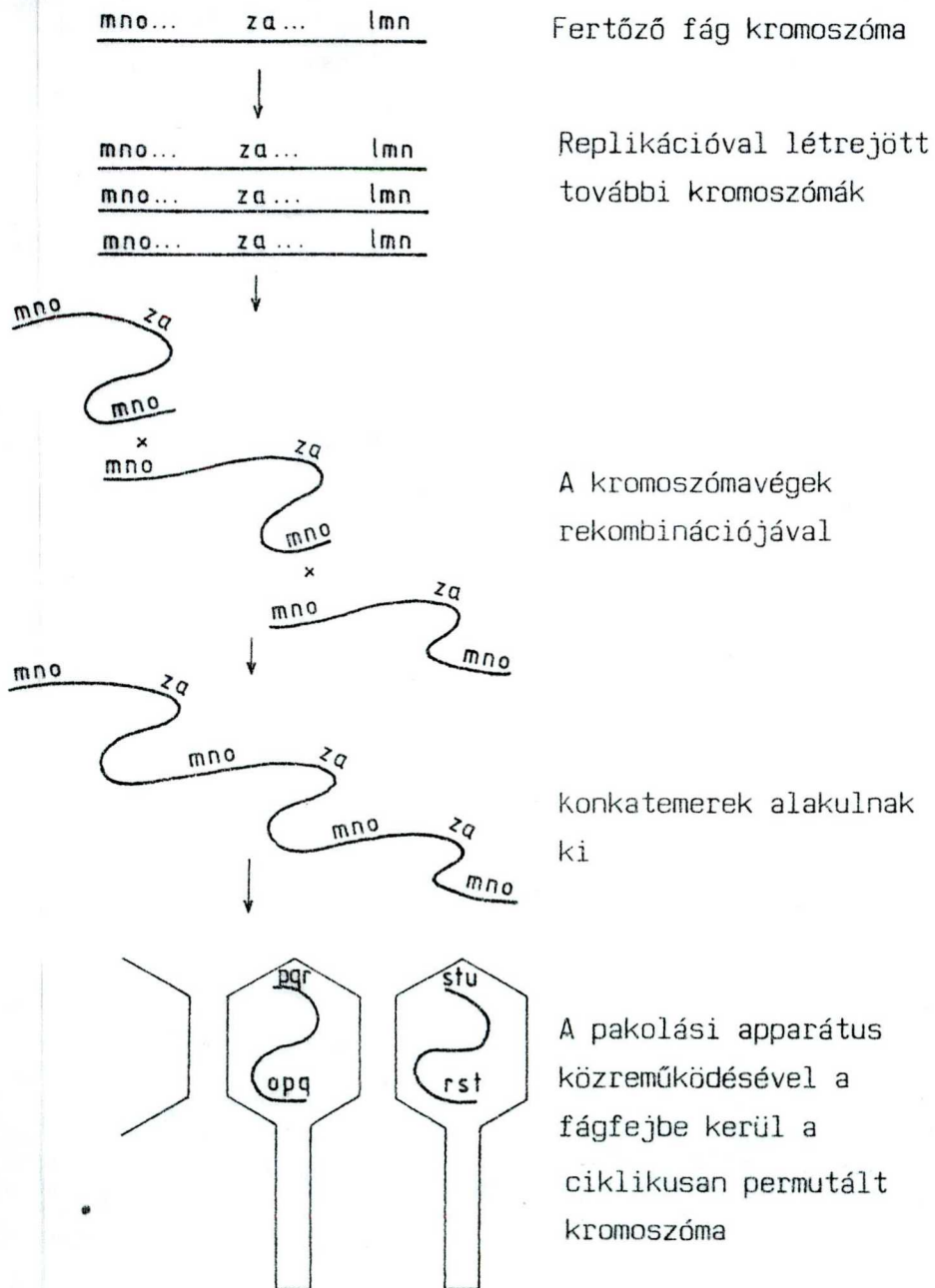
kombinációt nemcsak a fág és a baktérium "attachment" helyei között hoz létre, hanem két fág att helyei között is. Az e helyek között kialakuló Holliday szerkezet bizonyos -

kis gyakorisággal elvándorol erről a területről, és az att helyen kívül máshol megoldódva ott hoz létre rekombinációt.

II.2.C) A T4 fág és rekombinációja

Ha λ -nál azzal kezdtem az alfejezetet, hogy a fág kromoszómaciklusának áttekintése szükséges a rekombinációs folyamatok jobb megértéséhez, akkor a T4 fág esetében ez egyenesen elengedhetetlen. Lássuk tehát milyen a szóban forgó fág, hogyan szaporodik, és milyen szerep jut ebben a rekombinációnak (5. ábra).

A T4 fág kromoszómája akárcsak a λ -é, a virionban Watson-Crick duplex formájában foglal helyet. Mégis merőben más szerkezetű ez a kromoszóma. Míg a λ -egyedekben a DNS szekvenciája azonos, a T4-ben az a furcsaság tapasztalható, hogy azonos genotípusú egyedekben a DNS kettősspirál bázissorrendjei különbözőek. Ugyanis a T4 fág kb. 200 génje a kromoszómában cirkulárisan permutálva helyezkedik el, azaz a gének bármelyike lehet a kromoszóma egyik végén, s a másik vég felé haladva meghatározott sorrend szerint követik egymást. Van még egy jellegzetessége a T4-kromoszóma felépítésének. A genomban 3-4 gén duplán megtalálható: a fág részecske kromoszómájának egyik, és másik végén is - terminális redundancia (Streisinger, E.,



5. ábra. A T4 fág kromoszómaciklusa

Edgar, R.S. és Denhardt, G.H., 1964; illetve Streisinger, G., Embrick, J. és Stahl, M.M., 1966 alapján). A λ -tól eltérően a T4 maga szolgáltatja saját replikációs enzimjeinek legtöbbjét. A fág replikáció egymás utáni menetei itt olyan lineáris kromoszómákat hoznak létre, amelyek szekvenciája megegyezik az E. coli sejtet fertőző T4 fág kromoszómájának szekvenciájával. Az így keletkező egyedi kromoszómák a terminális átfedő régiókban rekombinálnak egymással, s ennek segítségével konkatemerekké rendeződnek. A T4 pakoló apparátusa is - ebben hasonlít a λ -éhoz - kizárólag konkatemer szubsztrátból csomagolja és vágja "méretre" az egyedi kromoszómákat. Itt azonban a DNS vágás nem szekvenciaspecifikus (ez biztosítja a kromoszómák egymáshoz viszonyított cirkuláris permutációját), hanem olyan nagyságú DNS darab vágódik le a konkatemerből, amely éppen beleillik egy T4 fág fejébe. Ennek nagysága néhány ezer bázispárral hosszabb egy teljes T4 genomnál (ebből adódik a fág terminális redundanciája). Az ismertetett folyamat tanulmányozható a 5. ábra segítségével. Érzékelhetjük a rekombináció nélkülözhetetlen szerepét a fág életciklusának során: a konkatemer kromoszómák képzésében.

A fent leírt kromoszóma-jellegzetességek miatt igen nehéz volt a T4 rekombinációs rendszerének vizsgálata, sőt



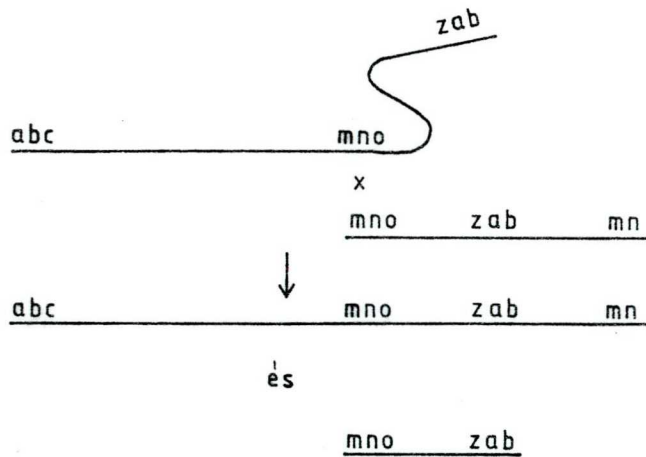
még a kromoszóma genetikai térképezéséhez is különböző furfangos megoldásokra volt a kutatóknak szükségük. Először a "single burs"-öt használták itt genetikai analízis céljára sikeresen. Ilyen kísérletekkel támasztották alá, hogy a T4 kromoszómavégek fontos szerepet játszanak a fág rekombinációjában. Kevert infekcióban például: ha a két szülő ab^+ $\times$ a^+b volt és egyik is, másik is homozigóta a terminális génjeire nézve, keresztezésükből többszörösen heterozigóta utódokat is kaptak nagy számban (6. ábra).



6. ábra

Ez az eredmény azzal magyarázható - mivel szabályos keresztezésekben a és b erősen kapcsoltak voltak -, hogy a T4 kromoszómavégek közelében igen nagy mértékű a rekombináció előfordulása. Ez érthető is, ha meggondoljuk a kromoszómavégek ún. fej-farok kicserélődésének jelentőségét az intracelluláris T4 klónok tagjai között a fág kromoszómaciklusának konkatemerképzésében. Hasonlóan a kromoszómavégek jelentős szerepét húzzák alá a normál és petite fágok keresztezéséből nyert eredmények "single burst"-ben.

A petite fágok kisebb méretűek a normál fágoknál, a kromoszómájuk nagysága is kb. 2/3-a a normálénak, így terminális redundanciájuk sincsen. Az ezekből a keresztezések-
ből származó utódfágokban a markerekkel jelölt petite kromoszómák szegmentjei minden elképzelhető variációban jelen voltak, bizonyítván, hogy rekombináció ment végbe a normál és petite fágrészekeskék között, sőt sugallva a következő mechanizmust a különböző T4 fág kromoszómák kicserélődési folyamatára (7. ábra).



7. ábra. A T4 fág kromoszóma-kicserélődési folyamata két különböző klónja között.

A T4 ilyen rekombinációs folyamatai egy, a T4 genomnál hosszabb, konkatermer molekulát, és egy kisebb töredéket eredményeznek.

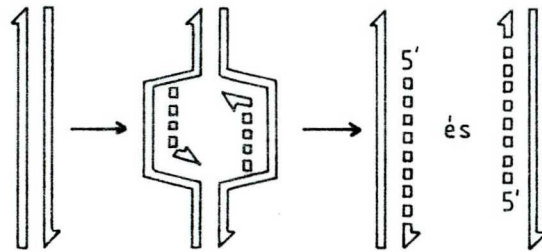
Az itt látható módon keletkeznek a pakolódáshoz a konkatemer molekulák is. Az ábra alapján megértjük, hogyan keletkezhetnek genetikailag kevert konkatemerek, illetve terminális génjeikben heterozigóta utódok. A T4-nek ilyen rekombináció mechanizmusát támasztják alá Tomizawa, J., illetve Broker, T.R. és Doermann, A.H. fizikailag jelölt T4 DNS molekulákkal végzett kísérletei is.

A rekombináció a T4 fágban visszahat a DNS-ének szintézisére is, ugyanis ha kellő idő elteltével nem alakulnak ki konkatemerek, akkor a replikáció mértéke fokozatosan csökken. Tehát a T4 esetében is több szempontból elengedhetetlen a rekombináció létrejötte a fág életciklusának során.

A T4 fágban a rekombináció egységnyi fizikai távolságra eső mértéke magas. Ezt a fenti rekombinációs mechanizmus mellett azzal magyarázzák, hogy a T4-kromoszóma a különböző klónokban kör alak szerint permutált, így a (különböző) klónok végein elhelyezkedő gének más klónok kromoszómájának közepére eshetnek, s ilyen módon a kromoszóma közepén elhelyezkedő géneknek is magas rekombinációs gyakoriságot kölcsönöznek.

Egy-két szót ejtsünk még a T4 replikációjának, illetve rekombinációjának molekuláris történéseiről is! Eből a szemszögből is látni fogjuk, hogy kiemelkedő jelentőséggel bír a T4 kromoszóma már sokszor emlegetett két kü-

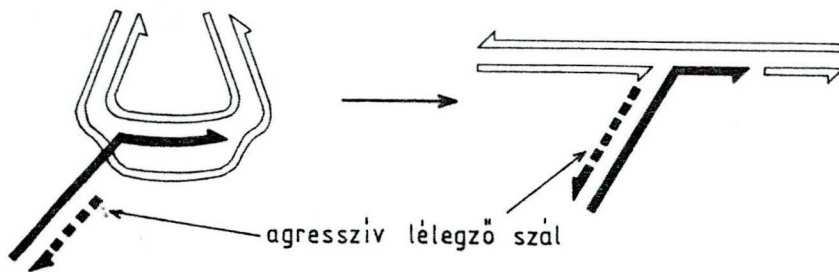
lönleges jellemvonása: a terminális redundancia és a permutált kromoszóma végei. A T4 fág DNS-ének replikációja a molekula permutáltsága miatt másképpen történik, mint azt már szervezetek esetében megszoktuk. A 8. ábra szemlélteti ezt a mechanizmust.



8. ábra. A T4 fág replikációja

A szaggatott vonal az új DNS szálát jelöli. A folyamatban azonban az újonnan szintetizálódott lánc mindig rövidebb lesz az eredetinél. Ez lehetőséget ad arra, hogy a komplementer láncok ún. "fej-farok" kapcsolódással dimert hozzanak létre. A kapcsolódás az egymásnak megfelelő láncok végi, redundáns területén következik be, s így nem vész el hasznos információ a fág-kromoszómából. A terminális egyes szálak magyarázatot adnak a végek rekombinációban betöltött fontos szerepére, s ezzel együtt a testvér-kromoszómák "fej-farok" genetikai rekombinációjának heves-

ségére is. A replikációban keletkező egyes láncrész agresszív szálként szerepelhet más T4 klónból származó kromoszómák intakt DNS-ével szemben, és a komplementer szakaszon "megtámadva" azt rekombinációs folyamatot indíthat. A 9. ábrán ezt is megfigyelhetjük.



9. ábra. A terminális egyszálú DNS szerepe a T4 rekombinációban

A helyéről kiszorított láncot enzimatikus folyamatok távolítják el. A szerkezet, amelyhez így jut a T4 kromoszóma T4-fertőzött E. coli sejtben azonosítható volt. (A T4 fág eddig felderített folyamatairól jó összefoglalást ad Mathews, Kutter, Mosing és Berget (1983) könyve, a: "Bacteriophage T4".)

II.2.D) A Rhizobium meliloti 16-3 fágjáról

A 16-3 fágot Balatonberény környékén izolálták talajmintából (Ördögh és Szende, 1961). Gazdája a Rhizobium meliloti 41 baktérium, ennek jelentőségéről már a Bevezetés című fejezetben megemlékeztem. Fágunknak több vad típusú variánsát is megtalálták Magyarország különböző tájain. Ilyenek a 11-es és a 36-os fág.

A 16-3 fág rendkívül gyorsan és hatékonyan adszorbeálódik a gazdasejtjéhez, de a DNS bejutása csak Ca^{++} ionok jelenlétében következik be. Életciklusának ideje hosszabb a λ -énál 28°C -on 100 perc, 36°C -on 80 perc, azonban érett fágreszecskeket találunk már a fertőzött Rhizobium sejtben 28°C -on 80, 36°C -on 65 perc eltelte után. Hasonlít a λ fághoz a 16-3 bakteriofág külső megjelenésében, valamint hasonló a struktúrfehérjék méretében és megoszlásában is.

A 16-3 fág genetikailag eléggé jól ismert. Meglehetősen sok - 150 - ts mutánsát izolálták (Orosz és Sík, 1970; Orosz és mtsai, 1973), amelyek a fág kromoszómaciklusában betöltött szerepük szerint korai és kései mutánsokra oszthatók. A korai működések feltételei a késeiek megnyilvánulásának. Ezeken kívül számos egyéb mutációja is ismeretes. Vannak a regulátorgénben különböző mutációk (hővel indukál-

ható, ún. ti mutációk, illetve feltétlen clear - tiszta tarfoltot létrehozó - mutációk), ismerünk host-range (farki rost) mutánsokat, fág antiszérum rezisztens, és lizozimot nem termelő mutánsokat. Léteznek a fágnek transzdukáló változatai is. Ezen mutánsok felhasználásával, illetve különböző deléciós mutánsok és pBR plazmidokba klónozott fág fragmentumok segítségével elkészült a bakteriofág genetikai és fizikai térképe (Orosz és Sík, 1970; Orosz és mtsai 1973; Dallmann és mtsai, 1979, 1980; illetve Dorgai és mtsai, 1981, 1983). Ezek alapján érdekes megjegyezni azt, hogy az eddig térképezett mutációk eloszlása a kromoszóma mentén nem egyenletes, a kései funkciók területén sűrűn jelölt a kromoszóma mutáns pontokkal, a korai gének területén már kevesebb pont ismert, a fág C génje (regulátor gén) ismét sűrűn ellátott markerekkel, és található a kromoszómán egy aránylag nagy "csendes" régió is.

A fág rekombinációs rendszere is tanulmányozott, bár nem tudunk olyan széleskörű ismeretekkel szolgálni, mint amilyenek az E. coli fágjainak tanulmányozásából származnak. Ez nem is olyan meglepő, ha figyelembe vesszük a fágnek λ -hoz vagy T4-hez viszonyított tudománybeli múltját, például csak az időt, amennyivel többen töltöttek már az imént említett két E. coli fág megismerésével (nem is beszélve más körülményekről). A 16-3 fágon végzett rekombinációs vizsgálatokból a következő eredmények származtak:

Ebben a fágban az egyszeres crossing overek sokkal gyakoribbak, mint a kétszeresek (Orosz, Rostás és Hotchkiss, 1980), és nincs jele negatív interferenciának vagy markerhatásnak. Ez összefüggésben van azzal, hogy *Rhizobium meliloti* 41-ben a mismatch repair hatékonysága kicsi (Orosz L., Páy A. és Dallmann G., 1980). A *Rhizobium meliloti* 41-ben található többi repair rendszereket és az ezekkel összefüggésben levő rekombinációs rendszereket Olasz Ferenc kollégám tanulmányozta, jó összefoglalást és összehasonlítást adott az *E. coli* hasonló rendszereivel magyar nyelven egyetemi doktori értekezésében (illetve: Olasz és mtsai, 1983).

A 16-3 fágok rekombinációs intermedierjeiben nagy kiterjedésű heteroduplex régiók is találhatóak, annak köszönhetően, hogy a Holliday szerkezet kereszthídja kísérleti bizonyítékok alapján nagy távolságokat vándorol a fág kromoszóma mentén (Orosz, Rostás és Hotchkiss, 1980; Orosz, 1980).

Azonosították munkatársaim a 16-3 fágban az általános rekombináció génjét (*red*), a fág integrációjáért felelős - a λ int és *xis* génjeinek megfelelő - géneket, illetve a kapcsolódásban alapvető fontosságú *attP* helyet. Ezeknek fizikai helyzete is ismert a fág-kromoszómán (Olasz, Dorgai, Papp, Hermes, Kósa és Orosz, 1985, illetve Dorgai és mtsai, 1981).

III. CÉLKITŰZÉS

Amikor én e dolgozatban ismerttetett munkához láttam, már elég sok ismeret felhalmozódott a 16-3 fág - Rhizobium meliloti rendszert illetően.

Ismert volt a fág genetikai és fizikai térképe (Orosz és Sík, 1970; Orosz és mtsai, 1973, 1980; Dallmann és mtsai, 1979, 1980; Dorgai és mtsai, 1981, 1983). A két térkép orientálása is megtörtént (Dallmann és mtsai, 1979; Dorgai és mtsai, 1981), és a baktérium rekombinációs és repair rendszerét is tanulmányozták már (Olasz F. Egyetemi doktori értekezés, 1983). A fág genetikai térképén azonban egy nagy - 25 kb-nyi - csendes régió helyezkedett el, ahová nem térképeződött semmilyen addig behatárolt mutánsunk, és a két térkép megfeleltetése is csak néhány ponton nyugodott.

Mivel munkacsoportunk egyik célja a 16-3 -ból fágvektor kialakítása volt, ezért fontos volt számunkra, hogy a csendes régióról eldöntsük, vajon valóban nem esik-e arra a kromoszómaszakaszra valamilyen fontosabb fágfunkciót ellátó gén. Ezen kívül a további munkánkban szükség volt a fizikai és genetikai térkép pontosabb megfeleltetésére is. Így én feladatul kaptam a még ismeretlen elhelyezkedésű ts (termoszenzitív = hőérzékeny) mutánsok genetikai térképezését és fizikai elhelyezését a fágkromoszómán.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. Táptalajok, antibiotikumok, aminosavak, baktérium és fág-törzsek, plazmidok

IV.1.A) Táptalajok: YTB komplett tápoldat (Orosz és Sík, 1970)

YTA komplett alapagar: YTB tápoldat kiegészítve 1,5 % agarral (Dif , Oxoid vagy mosott Reanal szálas agar)

YTA fedőagar: YTB tápoldat kiegészítve 0,6 % Dif . vagy Oxoid agarral

GTS minimál oldat, illetve alap agar
(Kondorosi és mtsai, 1977)

A baktériumok hígítására használatos folyadék: a fiziológiás sóoldat: 0,9 % NaCl.

IV.1.B) A táptalajokba adott antibiotikumok és aminosavak (1. táblázat).

1. táblázat

Neve	A táptalajban használt végkoncentrációja származása	/ug/ml
<u>Antibiotikumok:</u>		
Ampicillin	(Amp) Beecham Res. Labor	30
Chloramphenicol	(Chl) Serva	30
Mycerin	(Myc) A Medexport által behozott szovjet gyártmányú	30
Streptomycin	(Str) EGYT	200
Tetracyclin	(Tc) Pharmachim v. Chinoi	25
<u>Aminosavak:</u>		
Cystein	(cys)	50
Leucin	(leu) REANAL	50
Prolin	(pro)	50

IV.1.C) Baktériumtörzsek (2. táblázat)

2. táblázat

Baktériumok	Forrás vagy hivatkozás
<u>Rhizobium meliloti 41</u>	
R.m. 41 vad típus	Szende Kálmán
cys46 ⁻ = F46	Sváb és mtsai, 1978.
cys46 ⁻ Ø ^R 10	cys46 ⁻ mutánsból Palágyi Zs. izolálta
<u>Escherichia coli</u>	
HB 101 rec A, hsd R, hsd M, Str ^R , uvr ⁻ , pro ⁻ , leu ⁻	Boyer és Roulland-Dussoix, 1969)

IV.1.D) Plazmidok (3. táblázat)

3. táblázat

Plazmid	Marker	Inszer	Forrás vagy hivatkozás
pBR 322	Amp ^R Tc ^R		Bolivar és mtsai, 1977
pEH 109	Tc ^R		Hermesz E.
xpDH 1	Tc ^R (16-3 -- EcoRI:O,C,D,L,H)		Dorgai és Hermesz, 1983
xpDH 31	Tc ^R (16-3 -- EcoRI:EI ,O,C,D,L)		"
xpDH 51	Tc ^R (16-3 -- EcoRI:A,P,M,EI,O,C,D)		"
xpDH 216	Tc ^R (16-3 -- EcoRI:J,F,A,P,M,EI)		"
pSUP 106	Chl ^R Tc ^R		Simon, Priefer and Pühler, 1983
xxpPZS 5	Chl ^R (16-3 -- BamHI:F,N)		
xxpPZS 6 = pPZS 167	Chl ^R (16-3 -- BamHI:SM)		
xxpPZS 152	Chl ^R (16-3 -- BamHI:F)		Palágyi Zsuzsanna
xxpPZS 156	Chl ^R (16-3 -- BamHI:G)		saját klónjai
xxpPZS 161	Chl ^R (16-3 -- BamHI:H)		
xxpPZS 163	Chl ^R (16-3 -- BamHI:J)		
xxpPZS 164	Chl ^R (16-3 -- BamHI:D,H)		
xxpPZS 191	Chl ^R (16-3 -- BamHI:D)		

x: pLAFR-I. az alapvektora

xx: pSUP 106 az alapvektora

IV.1.E) Fágtörzsek (4. táblázat)

4. táblázat

F á g t ö r z s e k	F e n o t í p u s	Forrás vagy hivatkozás
A 16-3 fág mutánsai:		
1) ts mutánsai:		
ts2	c ⁺ ts5124	
ti4ts2	ti3ts5124	
ti4ts4	ti4ts5215	
ti4ts5	ti?ts5231	28 °C-on zavaros tartoltúak,
ti4ts6	ti?ts5245	36 °C-on nem nőnek
ti4ts411	ti4ts5255	(nem képeznek tarfoltot).
ti4ts518	ti4ts5260	A ti mutációt tartalmazó
ti?ts544	ti4ts5322	fágok revertánsai 36 °C-on
ti4ts5104	ti4ts5326	tiszta tarfoltúak.
ti4ts5107	ti?ts5330	
ti4ts5110	ti?ts5334	
ti4ts5113	ti?ts5335	
ti?ts5114	ti?ts5336	
ti4ts5115	ti4ts5340	
ti4ts5121		
2) host range mutánsok:		
ti3h6		Zavaros tarfoltú, tiszta tarfoltú
ti4ts2h6	c ⁺ ts5124h6	28 °C-on zavaros tarfoltúak,
ti4ts5107h	ti4ts5255h	36 °C-on elpusztulnak, és
ti4ts5115h	ti?ts5336h	fágrezisztens (F46 Ø ^R 10) baktériumot is képesek fertőzni
3) Transzdukáló származékok:		
ti3Tr4-2		28 °C-on zavaros tarfoltú, 36 °C-on tiszta tarfoltú
		Dorgai L. (1981)

4. táblázat folyt.

Fág törzsek	Fenotípus	Forrás v. hivatkozás
Tr4-2 ts2, Tr4-2 ts5124	A többi transzdu-	Olasz Ferenc
Tr4-2 ts2h6, Tr4-2 ts5114h	káló 28 °C-on	Palágyi Zsuzsanna
Tr4-2 ts5124h6, Tr4-2 ts5231h	szintén zavaros tar-	
Tr4-2 ts544h	folttot képez, 36 °C-on nem nő. Mindezek a fágok az R.m. 41 bakté- rium cys 46 génjét hordozzák, így mi- nimál táptalajon F46 törzsön nőnek.	

IV.2. Klasszikus mikrobiális módszerek

A) Baktérium- és fág-tenyésztés, titrálás

- A baktériumokat és fágokat YTB tápoldatban 28 °C-on történő levegőztetéssel, az E. coli törzseket 36 °C-on szaporítottuk.

A baktériumtörzsek fenntartását a megfelelő szelekciós lemezre való szélesztés és Rhizobium meliloti törzsek esetében 28 °C-on, Escherichia coli törzsek esetén 36 °C-on történt inkubálás útján végeztük.

- A baktériumok titrálása a következő volt: 0,1 ml baktériumszuszpenziót szélesztettünk a megfelelő szelekciós lemezek felületére különböző hígításokból -

fiziológiás sóoldatban történő hígítás után.

- A fág törzsek titrálását Adams (1959) "Bacteriophages" című könyvében leírt kettős agarréteg módszerével hajtottuk végre.

B) Egyedi baktériumtelepek, illetve fágplakkok létrehozása, tesztelése

- Az egyedi baktériumtelepeket az A) pont alatt leírt baktérium titrálással hoztuk létre.
- Az egyedi plakkokat titrálás útján (Adams, 1959), illetve sodrással (Orosz, 1980) kaptuk.
- Az egyedi telepek és plakkok tesztelését a megfelelő szelekciós lemezekre történő szurkálás segítségével végeztük. (Egyedi telepek ellenőrző tesztelését még lásd a biokémiai módszerek között is, tulajdonképpen "Klónozott fragmentumok meghatározása" cím alatt is az első részben egyedi telepeket vizsgáltunk.)

C) Baktériumkeresztezés

Kondorosi és mtsai (1977) módszere szerint történt.

D) Fágkeresztezés

A különböző fág törzsek keresztezését Orosz és munkatársai által 1973-ban leírtak szerint végeztük el.

E) Baktériumtörzsek transzformálása

Kizárólag *E. coli* törzseket transzformáltunk jó hatásfokkal Douglas Hanahan 1983-ban ismertetett "boszorkányos" módszerének használatával. Ez az eljárás kicsit bonyolultabb, mint a Cohen-féle kalcium kezeléssel, de az eredményeink igazolták használatát.

F) Marker rescue módszerek

Ezt a már esetünkben előzőleg biokémiai lépéseket is feltételező módszert akár a következő alfejezetben is tárgyalhattam volna. Az ok, ami miatt mégis itt kerítettem sort rá az, hogy az előzményektől eltekintve az általunk ilyen címszó alatt használt eljárások a klaszikus genetika módszereivel dolgoznak.

A módszer lényege az, hogy különböző kisebb-nagyobb kromoszómaszakaszok vizsgálhatók segítségével, oly módon, hogy parciális diploidot hozunk létre a baktériumsejten belül. Ha a bevitt kromoszómadarab heterozigóta a megfelelő genomrészlethez képest, és a kétféle allélt - vagy több különböző allélt - kísérleti rendszerünkben meg tudjuk különböztetni egymástól, akkor lehetővé válik a kromoszómán elhelyezkedő gének fizikai helyzetének meghatározása. A szóban forgó kromoszómadarab ugyanis komplementálhatja a kromoszóma megfelelő régió-

jában elhelyezkedő cisztronjait (ehhez azonban az szükséges, hogy teljes hosszúságában legyen(ek) meg gén(ek) a bejuttatott kromoszómaszegmensen), vagy rekombináció útján beépülhet a kromoszómába - kicserélődve az eredetileg ott helyet foglaló genomrészlettel.

Mi a technikai kivitelezést tekintve háromféle módon végeztük el marker rescue kísérleteinket:

1.) Komplementációs marker rescue

Gyors és egyszerű módszer: 16-3 (BamHI) fragmentum(ok)-ot - Pühler-féle plazmidvektorba (pSUP 106) klónozva - tartalmazó *Rhizobium meliloti* törzsön titráltuk meg a különböző azonosítható ts fágokat és figyeltük, hogy mennyi vad típusú, ts⁺ fág mutatkozik. Csak a reverzió fölött legalább 2 nagyságrenddel nagyobb ts⁺ titert fogadtuk el pozitív komplementációs eredménynek.

2) Rekombinációs marker rescue - gyors teszt.

Ezt a módszert olyan esetre dolgoztuk ki, és alkalmaztuk, amikor a klónozott 16-3 DNS-t tartalmazó *Rhizobium* törzsünk 36 °C-on nem volt életképes. A vizsgálandó ts fágokat egyenként kicsöppentettük a szóban forgó klónra, és 28 °C-on növesztettük 1 napig. Ezután tápfolyadékba lemostuk a makroplakkot (= a csöppentés helyén felnövő fágokat), meghígítottuk, majd a megfelelő hígításokból lemezelünk 0,1-0,1 ml fáguszuszpenziókat, illetve 0,2-0,2 ml F46 bak-

térium oldatokat fedőagarba. Ismét a 36 °C-on felnövő ts⁺ fágokra szelektáltunk. Kontrollként F46-ra csöppentett ts fágokat használtunk, a fent leírt eljárás azonos lépcsői után lezelve, és 36 °C-on inkubálva.

3.) Rekombinációs marker rescue

Ez az eljárás az előzőeknél kissé bonyolultabb, lényege az, hogy a rekombinációnak kedvező körülményeket hozunk létre a 16-3 DNS fragmentet tartalmazó ts fággal fertőzött Rhizobium klónokban. A módszer gyakorlati kivitelezése nagyon hasonlít a fágkereszteszéshez (Orosz és mtsai, 1973). A különbség csupán annyi volt, hogy egyféle ts mutáns fággal fertőztük a megfelelő Rhizobium klónt (abban már ugyanis jelen volt a pSUP 106 plazmidvektroba klónozott 16-3 DNS darab), s kontrollként 16-3 DNS-t klónozottan nem tartalmazó Rhizobiumon a fágkereszteszési körülményeknek megfelelően szaporított ugyanolyan ts mutáns fágot használtunk. Mindkét esetben a fágokat 28 °C-ra és 36 °C-ra is titráltuk. Azonos nagyságrendbe tartozó 28 °C-os fágtiterek esetén pozitív eredményként a 16-3 DNS-klónt hordozó Rhizobiumon kapott, a kontrollhoz képest legalább egy nagyságrenddel nagyobb fágtitert fogadtuk el.

IV.3. Biokémiai módszerek

A) DNS tisztítása

1.) A fág DNS preparálását és tisztítását Yamamoto és mtsai (1970) szerint - amelyet Dallmann és mtsai módosítottak 1979-ben - végeztük. Jó minőségű, klónozásra alkalmas fág DNS-t nyertünk így $ti3h6$ -ból.

2.) A plazmid DNS preparálását kétféle módon is végrehajtottuk:

- Sorozat teszteléshez, ellenőrzéshez kis mennyiségből (1,5-3 ml baktériumkultúrából) tisztítottunk DNS-t a Molecular cloning (Maniatis és mtsai) című kézikönyv útmutatásai szerint az ún. alkalikus lízis módszerrel (Birnboim és Doly módszere (1979) D. Ish-Horowicz módosításával).

- Nagyobb mennyiségű és klónozási munkákhoz is alkalmas minőségű plazmid DNS-t Godson és Vapnek (1973) módszerének kis módosítása szerint nyertünk.

B) DNS-ek vágása, tesztelése restrikciós enzimek segítségével

Az emésztésekhez használt restrikciós endonukleázok: BamHI, EcoRV, EcoRI, HindIII.

A DNS-ek emésztését mindenben a már előzőleg említett kézikönyv, a "Molecular cloning" 4. fejezetének tanácsai

szerint végeztük. Kivételt képez, hogy a BamHI enzimhez nem közepes (med), hanem magas sókoncentrációjú (high) puffert használtunk (minden emésztéséhez).

C) A DNS fragmentumok elválasztása

A DNS fragmentumokat agaróz gél-elektroforézis segítségével választottuk el. Elválasztásainkhoz 1 %-os vízszintes agaróz gélt használtunk. Az eljárás részleteire vonatkozólag ezesetben is a Maniatis és mtsai által írt "Molecular cloning" című Laboratóriumi Kézikönyv megfelelő (5.) fejezetét ajánlom.

D) Klónozás

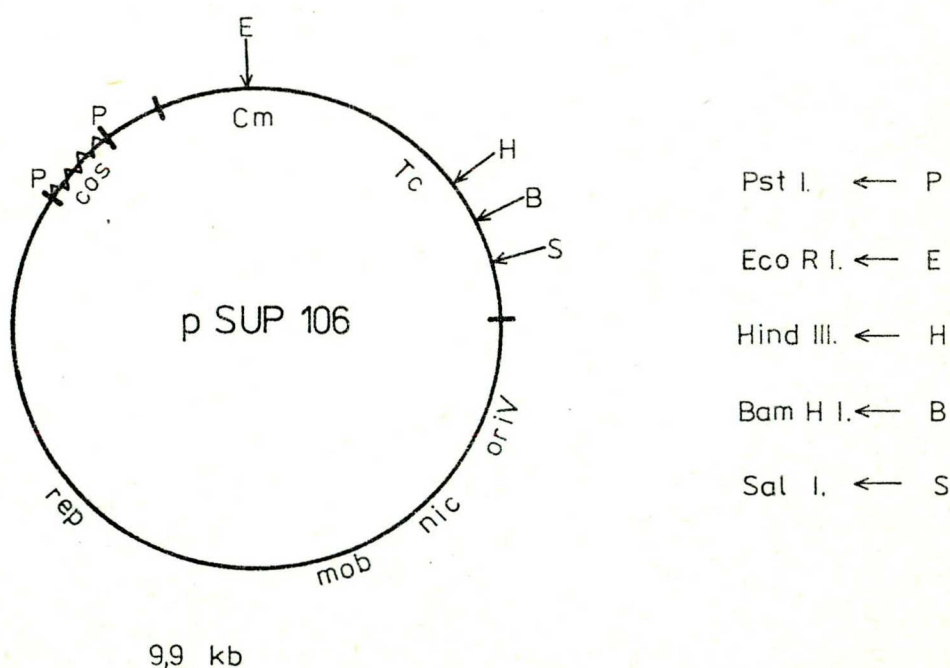
A megfelelő minőségű DNS-ek tisztítása és ellenőrzése (emésztés, illetve agaróz gélelektroforézis) után a ligálást munkatársam, Dorgai László által tisztított T4 DNS ligáz segítségével végeztük Cannon és mtsai (1977) módszere szerint. A baktériumsejtek transzformálása pedig a mikrobiális módszerek között már említett Hanahan-féle eljárással (D. Hanahan, 1983) történt.

E) A klónozott fragmentumok meghatározása, azonosítása

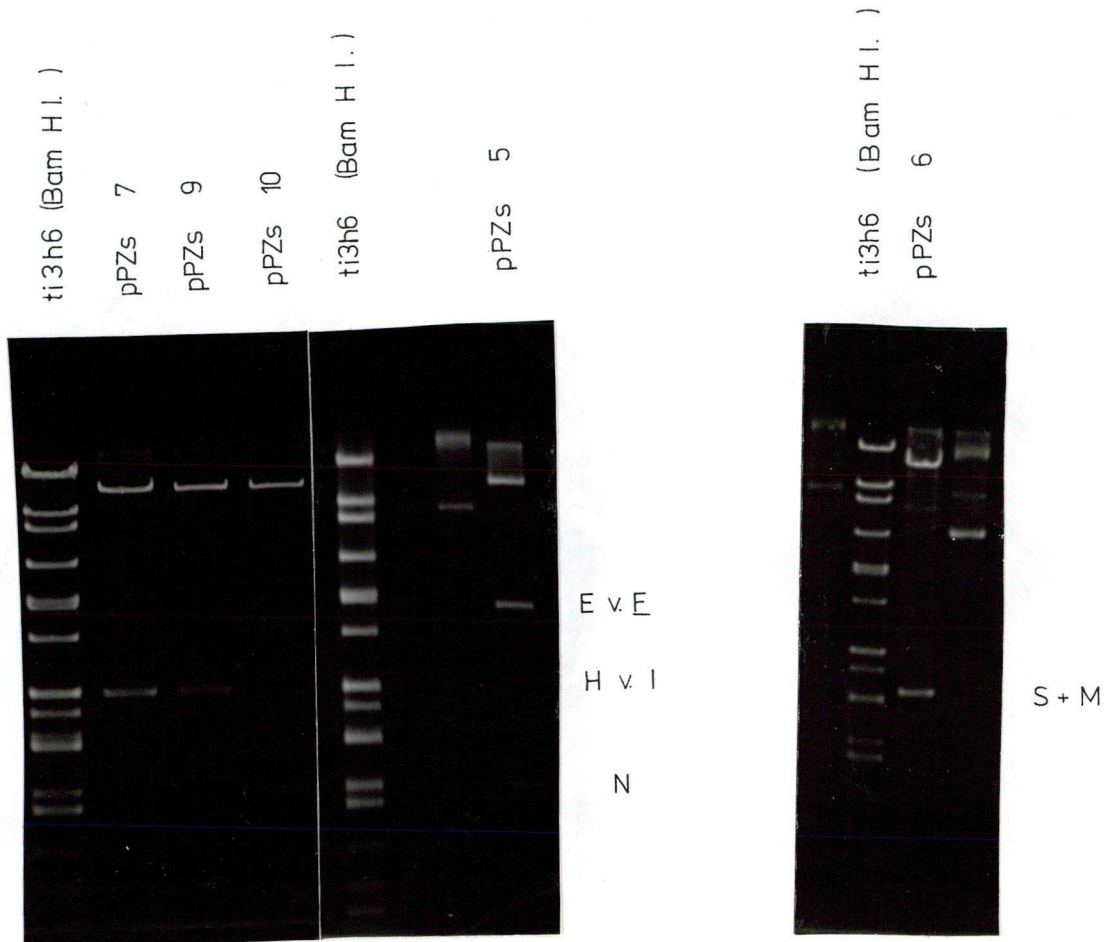
Az egyedi telepeket, amelyek a mikrobiális tesztek során úgy viselkednek, hogy bennük gyanítani lehetett 16-3 BamHI fragment(ek) jelenlétét (a klónozó vektor Chl^R -jét

mutatták, de a Tc^R -jét nem, ugyanis ebben a génben található az a BamHI hasítóhely, ahová klónoztuk a ti3h6 DNS fragmenteket), további vizsgálatoknak vetettük alá.

Először is: az ebben a fejezetben említett gyors alkalikus lízis módszerrel plazmid DNS-t tisztítottunk az érdekes baktérium klónokból (ezek eredetileg a transzformációból származó egyedi telepek voltak). Ezeket a klónozáshoz használt restrikciós enzimmal, BamHI-gyel visszaemésztettük, és szintén BamHI-gyel emésztett fág DNS kontroll mellett megfuttattuk 1 %-os agaróz gélen. Mivel a használt plazmid vektoron csak egyetlen hasítóhelye van ennek az enzimnek, a gélképek alapján meg tudtuk határozni sok fragmentumot (10, 11. ábra). Így azonban azokat a fágfragmentumo-

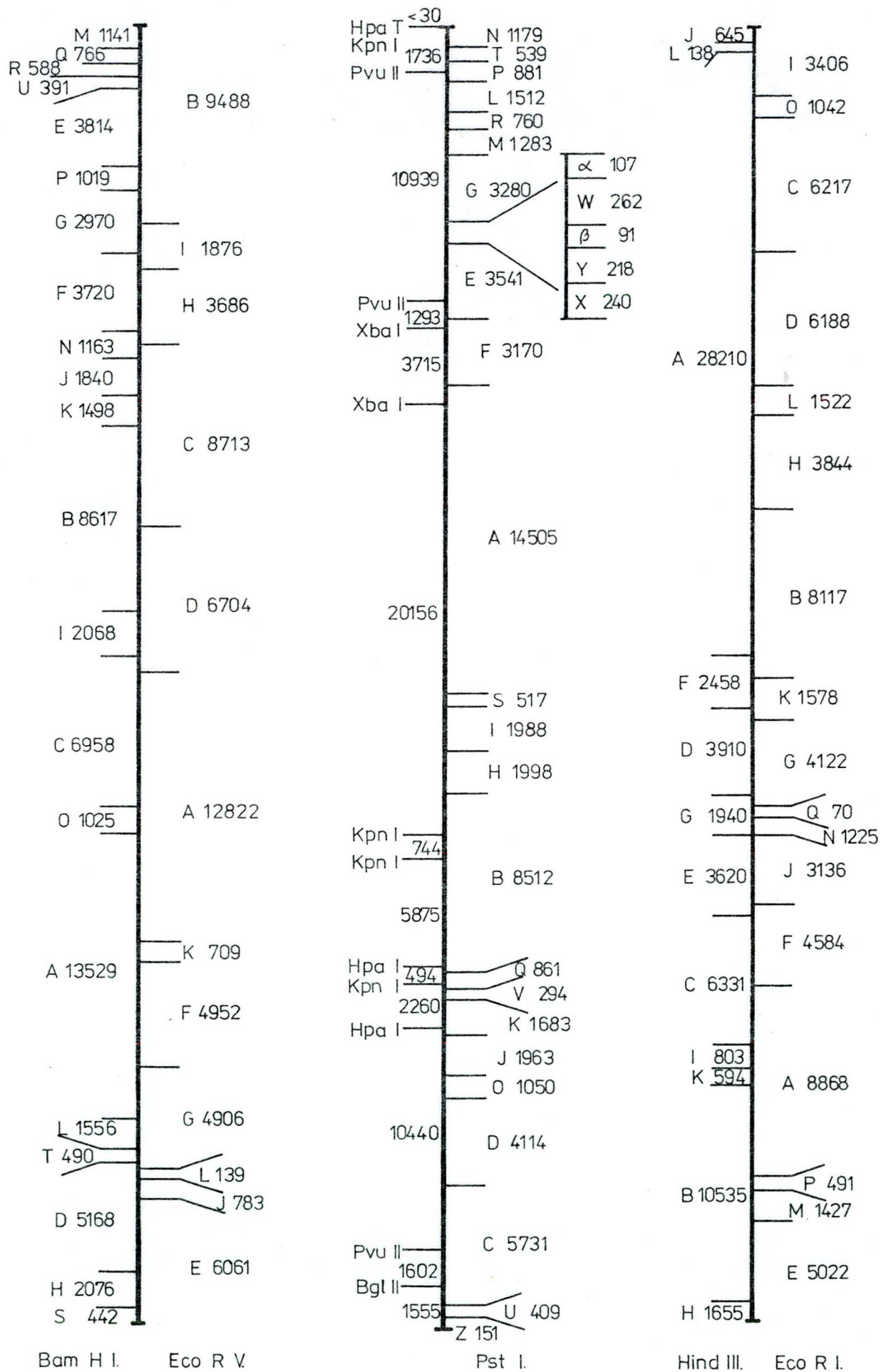


10. ábra. Pühler-féle plazmid vektor: pSUP 106



11. ábra. Klónozott fragmentumok meghatározása a klónból származó plazmid DNS BamHI visszaemésztése alapján

kat nem tudtuk azonosítani, amelyek valamelyik másik - hasonló molekulásúlyú fragmentummal - együtt futnak a gélben. Ezekben az esetekben a fágkromoszóma fizikai térképe alapján választottunk olyan más restrikciós enzimet, amely az egyik DNS fragmentumot hasította a másikat nem, s így megemésztve a kérdéses klónból származó DNS-t, el lehetett dönteni, hogy melyik fág DNS-darab integrálódott éppen abba a plazmid vektorba (10, 12. ábra).



12. ábra : A 16-3 bakterifág fizikai térképei a leggyakrabban használt 11 restrikciós endonukleázra.

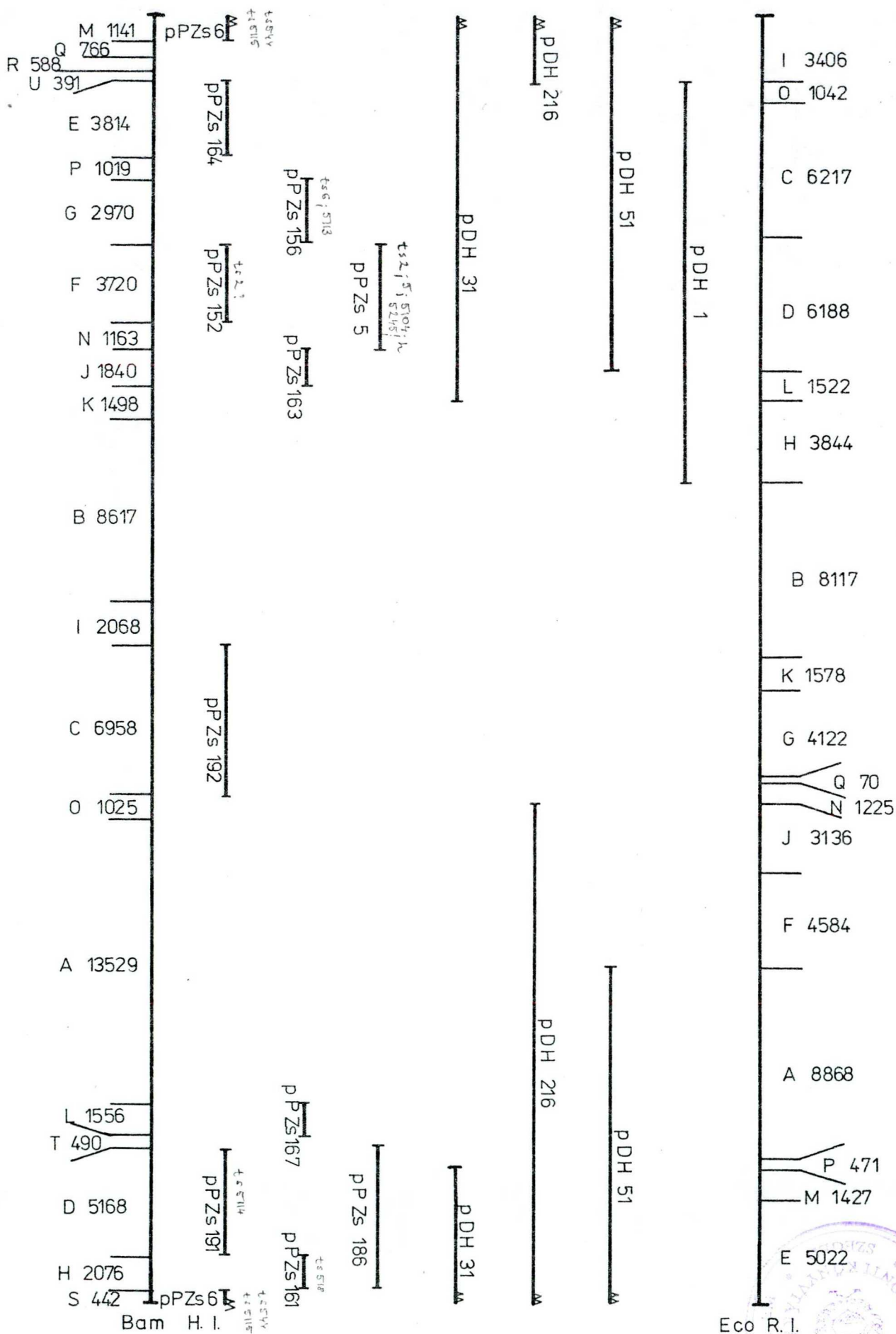
Azokban az esetekben, ahol a vektorba nemcsak egy fág fragmentum ékelődött, fontos volt, hogy a fragmentumok egymáshoz viszonyított orientációját is meghatározzuk. Ezt a klónból származó DNS preparátum megfelelő más enzimmel (nem BamHI-gyel) történő egyszerű emésztése, illetve ha szükséges volt kettős emésztése(i) révén oldottuk meg.

F) Klón azonosítás DNS-DNS hibridizálással

A hibridizációhoz a jelölt próbát magam készítettem nick transzlációval. A munka menete meglehetősen egyszerű volt, minthogy hozzá a BRL "Nick translation reagent kit" rendszerét használtam a cég által mellékelte előírásnak megfelelően. A jelöléshez használt α -³²P-ATP magyar gyártmányú - IZINTA-tól származó - volt.

A továbbiakban a hibridizálást Southern (1978) módszere szerint végeztem el.

13. ábra : A kísérleteimben használt PDH és pPZS klónok - illetve fizikailag azonosított ts mutánsok - elhelyezkedése a 16-3 fág fizikai térképén.



IV.4. Rövidítések jegyzéke

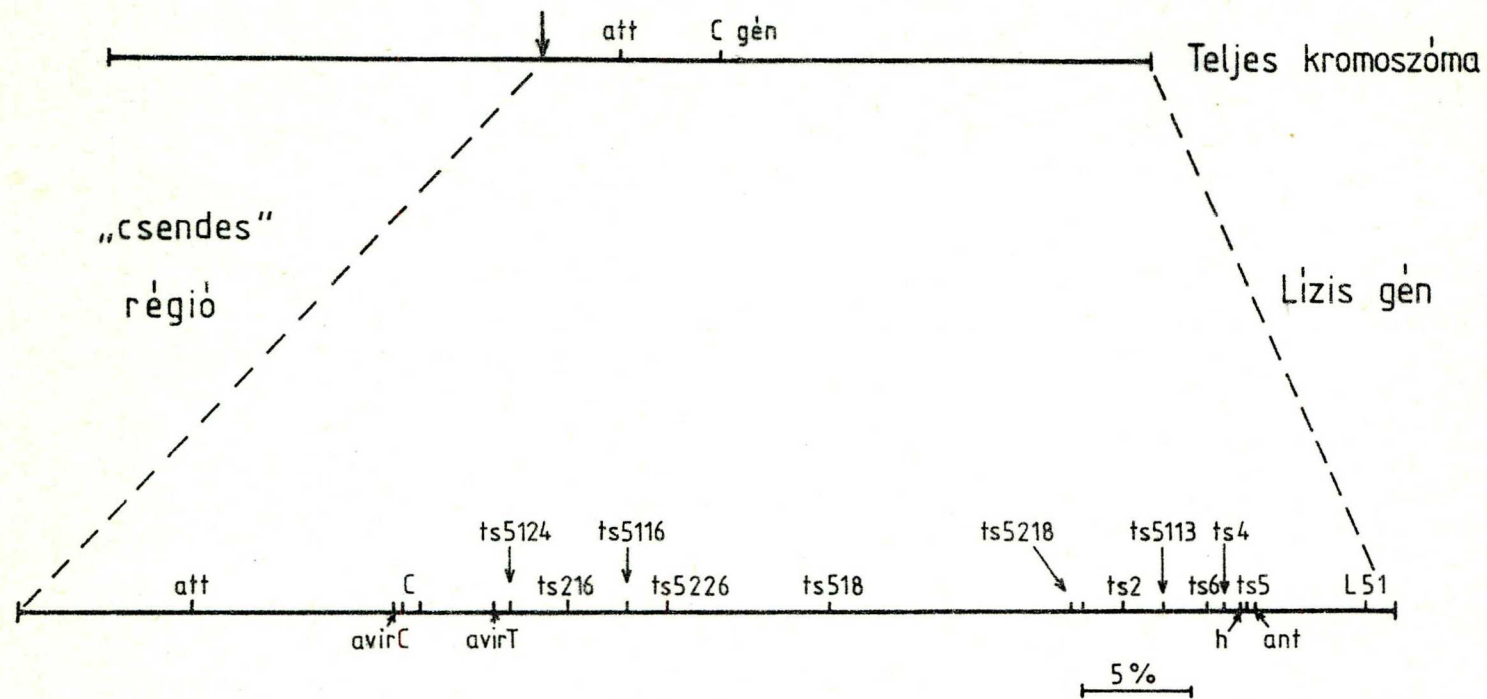
E. coli	= Escherichia coli
R.m. 41	= Rhizobium meliloti 41
λ	= az Escherichia coli λ mérsékelt bakteriofágja
T4	= az Escherichia coli T4 bakteriofágja
16-3	= a Rhizobium meliloti 16-3 jelű mérsékelt bakteriofágja
rec	= az E. coli rekombinációs génje
hsd R	= az E. coli restrikciós génje
hsd M	= az E. coli modifikációs génje
uvr	= az E. coli repair génje
att	= attachment hely - az Int rendszer által katalizált rekombinációban a fág és a baktérium kapcsolódásának helye
att B	= a baktérium kapcsolódásának helye a DNS-en
att P	= a fág kapcsolódási helye a kromoszómán
KB	= kilobázis, azaz 1000 bázispárnyi DNS darab
bp	= bázispár
c-gén	= a R. meliloti 41 16-3 jelű bakteriofágjának regulátor génje
ts	= termoszenzitív, azaz hőérzékeny mutáns/mutáció
ti	= termoinduktív, azaz hővel indukálható mutáns/mutáció

h	=	host-range mutáció/mutáns
cys ⁺	=	a cys 46 gént transzdukáló (fág) sajáttság
pro ⁻	=	prolin
leu ⁻	=	leucin
cys ⁻	=	cystein
Str ^R	=	Streptomycin
Myc ^R	=	Mycerin
Chl ^R	=	Chloramphenicol
Tc ^R	=	Tetracyclin
Amp ^R	=	Ampicillin
Ø ^R	=	fág rezisztencia
R%	=	rekombinációs gyakoriság, %-ban
Tr	=	cys 46 transzdukáló

V. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK

V.1. A többfaktoros keresztezésekhez szükséges tesztelő fágtörzsek előállítása

A "Célkitűzés" fejezetben már vázolt első feladat - az ismeretlen ts mutációk genetikai térképezése - megoldásához olyan tesztelő fágokra volt szükségünk, amelyek markerei lehetőleg jól közrefogják és több szegmentre osztják a fág kromoszómáját. Ilyen meggondolásokból választottunk egy-egy jól kezelhető korai: ts5124 és kései: ts2 mutánst. Ezeket elláttuk a cys 46 alléllal (Olasz Ferenc végezte), illetve az akkori genetikai térkép másik végén fekvő h markerrel, ezeket rákereszteltük a megfelelő két ts mutáns fág kromoszómájára. (A 14. ábra útmutatásul szolgál a fent említett mutációk, illetve allélek elhelyezkedésére.) Így a következő tesztelő fágokat állítottuk elő: Tr4-2 ts5124 és Tr4-2 ts2, illetve Tr4-2 ts5124h6 és Tr4-2 ts2h6. Ezen fágok kromoszómaikat összehozva az ismeretlen - még nem térképezett - ts mutációt hordozó fágok kromoszómaival, 3 illetve 4 pontos keresztezési rendszert kaptunk, amelyek jól használhatók szegregáció vizsgálatához. A tesztelő fágok kromoszómáira a ti3h6 mutáns (Orosz László izolátuma) farki rost mutációját ke-



Jelmagyarázat:

avir C; avir T: operátor m.
 ts: kondicionális m (termoszenzitív)
 h: fág farki rost m.
 ant: fág antiszérum rezisztens
 L51: lízis mutáns

14. ábra. A 16-3 fág genetikai térképe

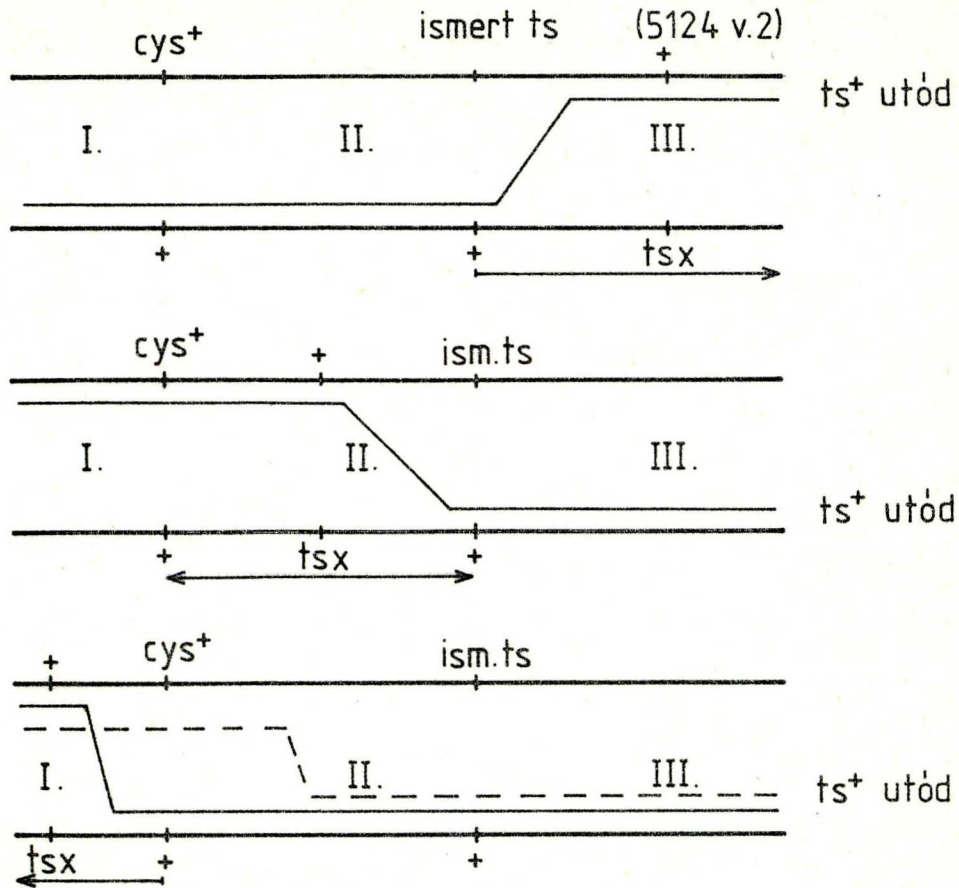
reszteztük rá. Emellett reciprok keresztezésekhez izoláltunk is h mutánsokat, illetve az ellenőrzésükhöz, szelektálásukhoz szükséges fágrezisztens baktériumot is előállítottuk. A fágrezisztens baktériumot F46 (cys 46⁻) Rhizobium meliloti törzsből szelektáltuk olyan módon, hogy F46 baktériumpázsitra annyi $\Delta 47$ bakteriofágot titráltunk, amennyi már minden egyes baktériumsejtet megfertőz. Mivel ez a fág tiszta tarfoltot képez, a tiszta ("tarrá rágott") lemezen könnyen észre lehet venni a spontán mutáció által létrejövő fágrezisztens baktérium kolóniát (1-2 telep maximum lemezenként). Az így kapott telepek közül 12 izolátumot szaporítottunk fel, s ezekből az F46 $\emptyset^R$ 10 törzset használtuk kísérleteinkhez.

Az újonnan izolált h mutánsokat úgy nyertük, hogy a már meglévő F46 $\emptyset^R$ 10 baktériumot megcsöppentettük a megfelelő ts mutáns fággal, amelyre h markert szerettünk volna vinni. Természetesen ebben az esetben csak a host range (farkirost) mutánsok nőttek fel a rezisztens baktériumon. A következőkben az így előállított tesztelő fágok segítségével elvégzett szegregációs kísérleteket szeretném ismertetni.

V.2. Hárompontos fágkeresztezések

A hárompontos keresztezésekben a két tesztelő fágunk a Tr4-2 ts5124 és a Tr4-2 ts2 voltak. A két tesztelő fággal végzett keresztezések úgy foghatók fel, mint a genetikai térkép két fix pontjához viszonyított futó pont (éppen az aktuális keresztezésben szereplő meghatározandó ts mutáció) helyzete. A két ismert marker a fágkromoszómát tükröző genetikai térképet három részre osztja, s attól függően, hogy az "ismeretlen" ts mutáció melyik régióban helyezkedik el (a három különböző lehetőséget a 15. ábra mutatja) más-más megoszlást várhatunk a nem szelektív markerra - cys-re - a rekombináns fágok között. A keresztezéseket ugyanis úgy végeztük, hogy a ts^+ rekombináns utódokra szelektáltunk, s az így nyert utódpopuláció tagjait - illetve elég nagy számú tagját: legalább 60-80 db plakkot - egyenként megvizsgáltuk, hogy tartalmazzák-e a nem szelektív cys 46 allélt.

A 15. ábrán látható első lehetőség szerint: ha az ismeretlen ts pont a III. régióba esik, akkor - abban az esetben, ha az ismert ts mutáció nem esik túl messze a cys 46 géntől - a nem transzdukáló fágok lesznek túlsúlyban a ts^+ rekombináns utódok között. A második esetben a két ismert pont között a II. régióban helyezkedik el a meg-



15. ábra. A hárompontos keresztezések lehetőségeinek változatai

Ábramagyarázat: A mutációkkal szembeni + jelek a vad fág allélt jelölik, míg a cys^+ helyek a bakteriális $cys\ 46$ gén jelenlétére utalnak, s az ezzel szemközt + jelek a $cys\ 46$ gén hiányát, helyette az eredeti fágkromoszóma megfelelő darabjának ottlétét mutatják.

határozandó ts mutáció. Ilyenkor a vad fenotípusú utódok között a cys 46-ot hordozók lesznek többségben, s annál inkább, minél közelebb található a meghatározandó ts mutáció a cys allélhoz. A harmadik lehetőség az, hogy a még nem térképezett ts pont az ábrán I-gyel jelölt régióban található. Ekkor transzdukáló és nem transzdukáló fágok is lesznek az általunk szelektált rekombináns utódok között, mégpedig olyan arányban, amilyenben a cys 46 allél osztja a két ts pont közötti távolságot. Minél közelebb van ugyanis az ismeretlen ts pont a cystein génhez (a cys $\rightarrow$ ismert ts távolsághoz viszonyítva) annál kisebb lesz a nem transzdukáló fágok részaránya a cys 46 allélt hordozókhoz, transzdukálókhöz képest a vad rekombináns fágok között.

Lássuk hát mit mutatnak az egyes kísérletekből származó adatok! Ezeket az 5. táblázat foglalja össze. A szegregációs adatok alapján a nem transzdukáló ts^+ utódok vannak túlsúlyban - a Tr4-2 ts5124-gyel végzett kísérletek eredményeit figyelve - a legtöbb esetben: a ts5260-nal, a ts5104-gyel, a ts5336-tal, a ts5245-tel, a ts544-gyel, a ts5107-tel, a ts5113-mal, a ts5231-gyel, a ts5114-gyel és a ts5330-cal végzett kísérleteinkből származó ts^+ rekombináns utódok között. A Tr4-2 ts2-öt használva tesztelő fégként hasonlóan az előzőekhez, az esetek többségében a

5. táblázat

A hárompontos keresztezések eredményei

Keresztezések	Rekombinációs gyakoriság %-ban	A ts^+ rekombináns utódok szegregációja			
		cys^+/ts^+		cys^-/ts^+	
		absz.ért.- ben	%-ban	absz.ért.- ben	%-ban
Tr4-2 $ts2$ x					
ti4ts5	1,41	44/221	19,9	177/221	80,1
ti4ts544	0,71	11/193	5,7	182/193	94,3
ti4ts5104	14,10	180/390	46,2	210/390	53,8
ti4ts5107	0,099	14/141	9,9	127/141	90,1
ti4ts5113	0,16	9/53	17,0	44/53	83,0
ti?ts5114	0,73	89/162	54,9	73/162	45,1
ti4ts5115	1,33	71/104	68,3	33/104	31,7

Tr4-2 $ts5124$ x					
ti?ts544	2,90	23/148	15,5	125/148	84,5
ti4ts5104	1,50	5/75	6,7	70/75	93,3
ti4ts5107	16,50	71/335	21,2	264/335	78,8
ti4ts5113	13,20	62/355	17,5	293/355	82,5
ti?ts5114	3,69	38/131	29,0	93/131	71,0
ti4ts5115	2,89	38/74	51,4	36/74	48,6
ti?ts5231	0,66	19/88	21,6	69/88	78,4
ti4ts5245	0,04	7/72	9,7	65/72	90,3
ti4ts5255	4,51	34/80	42,5	46/80	57,5
ti4ts5260	4,30	6/100	6,0	94/100	94,0
ti?ts5330	8,00	43/109	39,4	66/109	60,6
ti?ts5336	0,68	7/90	7,8	83/90	92,2

$cys^- ts^+$ fágok részaránya jóval nagyobb volt a $cys^+ ts^+$ utódokhoz képest. (A $ts5$ -tel, illetve a $ts5113$ -mal végzett keresztezések kontrollként szerepeltek.) A fennmaradó néhány keresztezésben a ts^+ rekombináns utódok 50 % körüli szegregációt mutattak a cys markerra. Így viselkedett a $ts5115$, a $ts5255$ (a $Tr4-2$ $ts5124$ -gyel végzett keresztezésekben), valamint a $ts5104$, a $ts5114$ és a $ts5115$ (a $Tr4-2$ $ts2$ -vel végzett kísérletekben). Ez azt sugallja, hogy a 15. ábra szerinti II. régióba, a cys 46 és az ismert ts mutáció közé a vizsgált ismeretlen ts -ek közül egy sem esett. Az a tény, hogy a cys 46 alléllal egyik vizsgálandó ts sem volt erősen kapcsolt, azt mutatja, hogy nem a cys marker közelében helyezkednek el a meghatározandó ts mutációk. Ez a megjegyzés az I. régióba eső ts pontok szempontjából fontos.

A hárompontos keresztezések eredményei alapján azt mondhatjuk, hogy az eddig térképezetlen ts mutációk nagy többsége a 15. ábrán I. és/vagy III. jelzett régiókba esik (a ts^+ utódok cys^- túlsúlya miatt), és amelyik az I. régióban van, a cys alléltól távol helyezkedhet el (a cys 46 és a $ts5124$ távolságánál többszörös távolságban). Megjegyzendő, hogy csupán a 3 pontos keresztezési adatok alapján az I. és III. illetve a II. és III. régióba eső mutációk esetei nem különíthetők el jól egymástól.

A megközelítőleg 50-50 %-os cys^+ / cys^- megoszlást eredményező keresztezések arra utalnak - a Tr4-2 ts5124-gyel végzett keresztezéseket tekintve -, hogy az I. régióban található a vizsgált ts mutáns, de a cys 46 géntől nem olyan messze, mint az előző csoport tagjai. Három olyan meghatározandó ts mutáns szerepel még a táblázatban, amelyik eltérően viselkedik a kétféle tesztelő fággal szemben, s amelyekről még érdemes szót ejtenünk. Elsőnek nézzük a ti4 ts5115-öt! Ez a mutáns abba a kategóriába tartozik, amelyről a Tr4-2 ts5124-gyel végzett keresztezések kapcsán már szólhatunk: tudniillik, hogy az a mutáció a fág genetikai térképén a cys 46 alléltól balra eshet (I. régió), de nem túl nagy távolságra attól. Ez alatt azt értem, hogy a cys - ts5124 távolsághoz hasonló távolságra lehet, ugyanis ezesetben a Tr4-2 ts5124-gyel szembeni keresztezésben - a két megközelítőleg azonos nagyságú crossing over régió miatt - a cys^+ és $cys^- ts^+$ utódok egyenlő valószínűséggel keletkezhetnek. Mivel azonban a ts2 távolsága a cys alléltól csaknem : hatszorosa a $cys \rightarrow ts5124$ távolságnak, érthető, hogy a ts5115 a Tr4-2 ts2-vel szembeni keresztezésekben nagyobb arányban ad cys^+ vad rekombináns. Ez a mutáns pont elhelyezhető még másféle módon is: a 15. ábrán jelölt II. régióba, ugyanis ha a ts2-höz közel található, akkor már cys -től akkora távolságban van, hogy ezen a kromoszómaszakaszon sok ket-

tős crossing over is lezajlódhat, és ebben az esetben a kettős rekombinációval keletkező ts^+ utódok száma is erősen megnövekedhet. A másik eset, amelyet még kiemelnék a $ti4\ ts5104$ és a $ti?\ ts5114$ (egyféle) viselkedése. Ezek ts^+ utódai a $Tr4-2\ ts2$ -vel történt keresztezéseikben megközelítőleg 50-50 %-os cys^+/cys^- megoszlást adtak, míg a $Tr4-2\ ts5124$ -gyel szebeniekben a ts^+ rekombináns utódok nagy többsége nem hordozta a $cys\ 46$ gént. Ez a viselkedés akkor magyarázható, ha feltételezzük, hogy ez a két mutáció körülbelül akkora - vagy valamivel nagyobb - távolságra helyezkedhet el cys markertől balra a géntérképen, mint a $ts2$ a cys -től jobbra. Ekkor ugyanis a nagyjából azonos távolságok miatt $Tr4-2\ ts2$ -vel szemben fele-fele arányban kaphatunk cys^+/cys^- megoszlást a ts^+ utódok között, ugyanakkor, mivel ebben a helyzetben az ismeretlen ts pont ($ts5104$, illetve $ts5114$) távolsága cys -hez körülbelül hatszor akkora, mint a $cys\ 46$ és $ts5124$ távolsága a géntérképen, így indokolható a cys^- ts^+ utódok többsége a $Tr4-2\ ts5124$ -gyel való keresztezéseikben. Egy másik alternatív magyarázat is adható e mutánsok $Tr4-2\ ts2$ -vel adott 50-50 %-os cys^+/cys^- megoszlására. A mutációk a cys -től jobbra is elhelyezkedhetnek, ha megfelelően nagy távolságra vannak. Meglehetősen nagy távolságban ugyanis nő a dupla crossing overrel keletkező rekombinánsok száma, esetenként kitehetik a ts^+ rekomb-

binánsok felét is.

A háromfaktoros keresztezésekben származó eredmények alapján - mint láttuk - néhány eddig nem ismert ts mutáció helye jól behatározható a fág-kromoszómát tükröző genetikai térképen, mások helye azonban nem határozható meg egyértelműen. Pedig ez utóbbi csoportba tartozik a vizsgált ts mutánsok többsége, azok amelyek mindkét tesztelő fággal szembeni keresztezésekben nem transzdukáló vad rekombinánsokat adtak (vagy ez utóbbi két fág esete is, amelyet az előbb elemeztünk). Ezek az előbbi ts pontok elhelyezhetők a 15. ábrán jelölt I. és III. régióba egyaránt, megfelelő feltételek mellett. (Erről már az előzőekben szóltam.) Ezért, hogy e pontok helyét meg lehessen határozni, szükség volt további, mostmár négyponthoz keresztezésekre.

V.3. Négyponthoz keresztezések

Az előző alfejezetben láttuk, hogy a mutánsok egy nagy csoportját nem tudtuk egyértelműen elhelyezni a genetikai térképen. Négyfaktoros keresztezéseink során elsősorban ezeket a ts mutánsokat vizsgáltuk. Ezekben az esetekben is ts^+ vad rekombinánsokra szelektáltunk, s mivel itt két nem szelektív allélunk is volt, így mind-

kettőre megvizsgáltuk a vad fenotípusú rekombinánsainkat. Ugyanazt a módszert követtük - mint az előzőekben -, hogy egyedi fág rekombinánsokat teszteltünk, vajon a két szelektív allél - vagy egyik közülük - jelen van-e bennük, vagy hiányzik. Ilyen módon a ts^+ utódokat négy csoportba sorolhattuk a nem szelektív allélek megoszlása alapján. Tekintsük az eredményeket összefoglaló 6. táblázatot! Az adatokat figyelve rögtön feltűnik, hogy a h^+ (nem host range) rekombináns nagyon kevés. Az első hét keresztezést figyelembe véve - ezek az eredeti négy pontos keresztezéseink -, észrevehetjük, hogy csupán egy esetben van kivétel, egy ts mutánsunk viselkedett másképpen ezekben a keresztezésekben a többiekhez képest. Mint már két mondatnál ezelőtt utaltam rá, a meghatározandó ts mutánsaink zöme nagyon kevés h^+ (vad típusú farki rosttal rendelkező) rekombinánsot adott ezekben a keresztezésekben (és azoknál csaknem - vagy ténylegesen - egyenlő volt a cys^+h^+ és a cys^-h^+ kategóriába tartozó ts^+ utódok száma). Ez a jelenség arra utal, hogy ezek a szóban forgó ts pontok a h marker közelében kell, hogy legyenek.

Az adatokból látható, hogy öt ts mutáció igen erős - 100 %-os - kapcsoltságot mutat a h markerral. Ezek a ts pontok biztosan a h mutáció közvetlen közelében helyezkednek el a géntérképen és a valószínű fág-kromoszómán is. Ezek a következők: $ts5231$, $ts5245$, $ts5336$, $ts5330$,

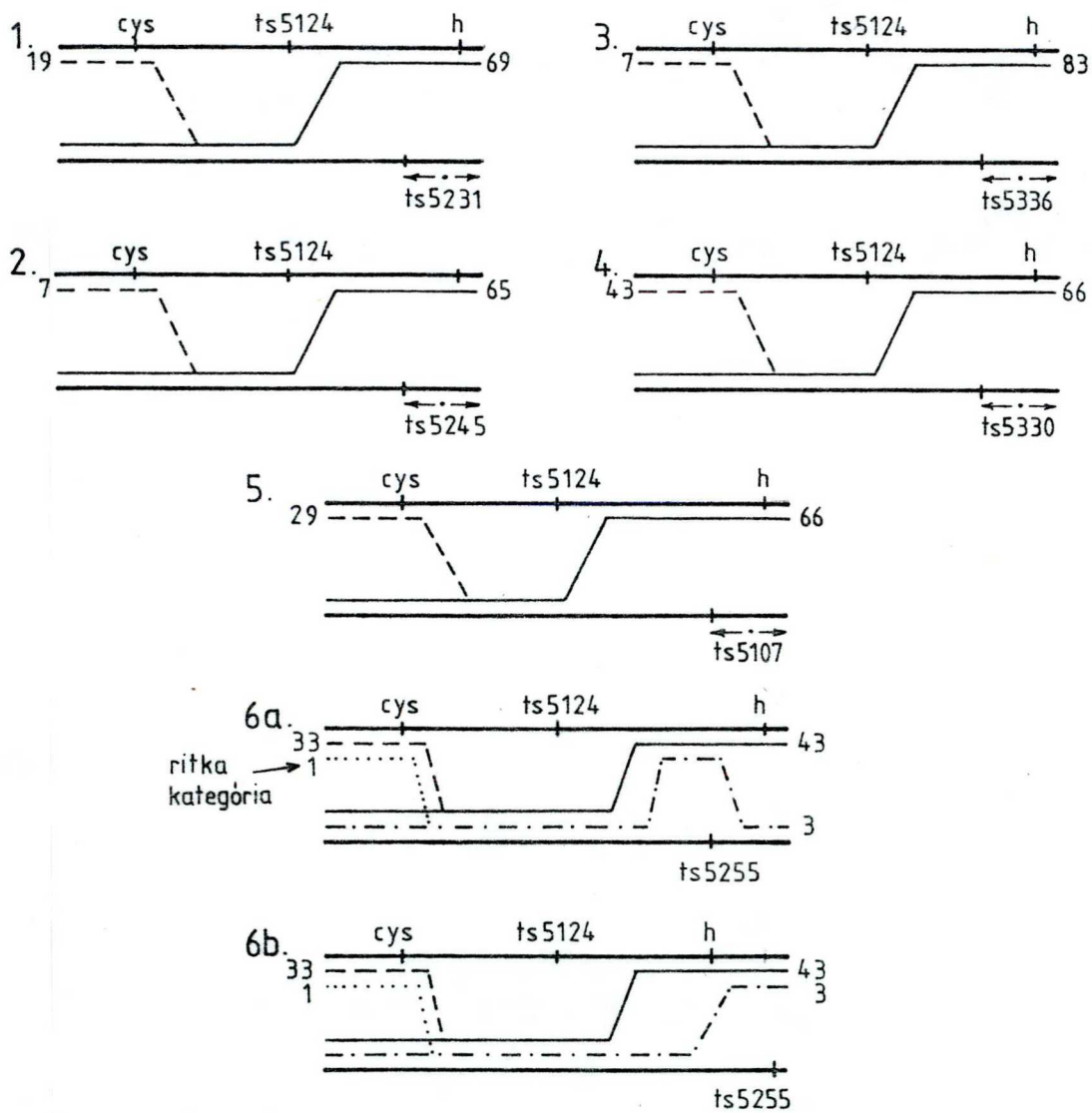
6. táblázat

A négy pontos keresztezések eredményei

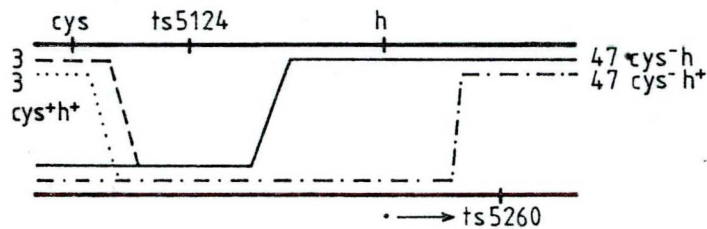
A ts ⁺ rekombináns utódok megoszlása								
Keresztezés	cys ⁺ h		cys ⁺ h ⁺		cys ⁻ h		cys ⁻ h ⁺	
	%-ban	absz.é.	%-ban	absz.é.	%-ban	absz.é.	%-ban	absz.é.
Tr4-2 ts5124h6 ti? ts5231 ^x	21,6	19	0	0	78,4	69	0	0
Tr4-2 ts5124h6 ti4 ts5245 ^x	9,7	7	0	0	90,2	65	0	0
Tr4-2 ts5124h6 ti4 ts5255 ^x	41,3	33	1,3	1	53,7	43	3,7	3
Tr4-2 ts5124h6 ti4 ts5260 ^x	3,0	3	3,0	3	47,0	47	47,0	47
Tr4-2 ts5124h6 ti? ts5336 ^x	7,8	7	0	0	92,2	83	0	0
Tr4-2 ts5124h6 ti? ts5330 ^x	39,5	43	0	0	60,5	66	0	0
Tr4-2 ts5124h6 ti4 ts5107 ^x	30,5	29	0	0	69,5	66	0	0
Tr4-2 ts5114h _c ⁺ ts5124 ^x	22,4	60	6,0	16	53,0	142	18,6	50
Tr4-2 ts5114h _c ⁺ ts2 ^x	49,2	66	0	0	50,8	68	0	0
Tr4-2 ts544h _c ⁺ ts5124 ^x	29,3	97	28,9	99	34,4	118	8,4	29
Tr4-2 ts544h _c ⁺ ts2 ^x	74,7	127	1,7	3	18,8	32	4,7	8
Tr4-2 ts5124h6 _c ⁺ ts2 ^x	22,6	26	0,9	1	74,8	86	1,7	2

ts5107. Valamivel kisebb mértékű, "csak" 95 % kapcsolásban van h-val a ts5255 elnevezésű ts pont, de ez a mutáció még mindig - az előzőek alapján - nagyon közel esik a h markerünkhöz. Az eddig tárgyalt esetekben a ts^+ rekombinások keletkezését, és a vizsgált pontok elhelyezkedését a genetikai térképen a 16. ábra szemlélteti. A 6. táblázat első részében további egy mutánsunk maradt, amellyel még nem foglalkoztunk. Ez a ts5260. E fág a Tr4-2 - ts5124h6 tesztelő fággal történő keresztezésében a következő ts^+ rekombinásokat szolgáltatva: fele-fele arányban kaptunk h markert tartalmazó és nem tartalmazó utód-fágokat, ellenben ezek túlnyomó többsége - 94 % - nem hordozta a cys 46 gént. Ez úgy képzelhető el, ha a szóban forgó ts mutáció a h markertől a genetikai térképen jobbra helyezkedik el nagyjából akkora távolságra, mint a ts5124 és h közötti szakasz. Ez az eset megismerhető a 17. ábrán.

Hátravan még a 6. táblázat második felében feltüntetett öt keresztezés megtárgyalása. Rendhagyó módon a legutolsóval: a Tr4-2 ts5124h6 x c^+ts2 fágkeresztezéssel kezdem a sort, ugyanis ez két ismert mutáció - a két tesztelő fágunk ts mutációt tartalmazza - s csak ellenőrzésként, viszonyítási kontrollként kerültek a keresztezéseink közé. Ez az ellenőrző próba azt igazolta, hogy szegregációs rendszerünk a várakozásnak megfelelően mű-



16. ábra. A meghatározandó ts pontok elhelyezkedése a négyponthoz tartozó keresztezési adatok alapján

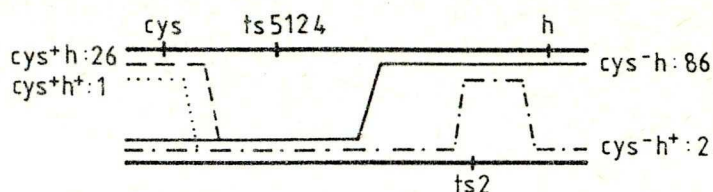


17. ábra. A ts5260 mutáció elhelyezése a géntérképen a négy pontos keresztezési adatok alapján

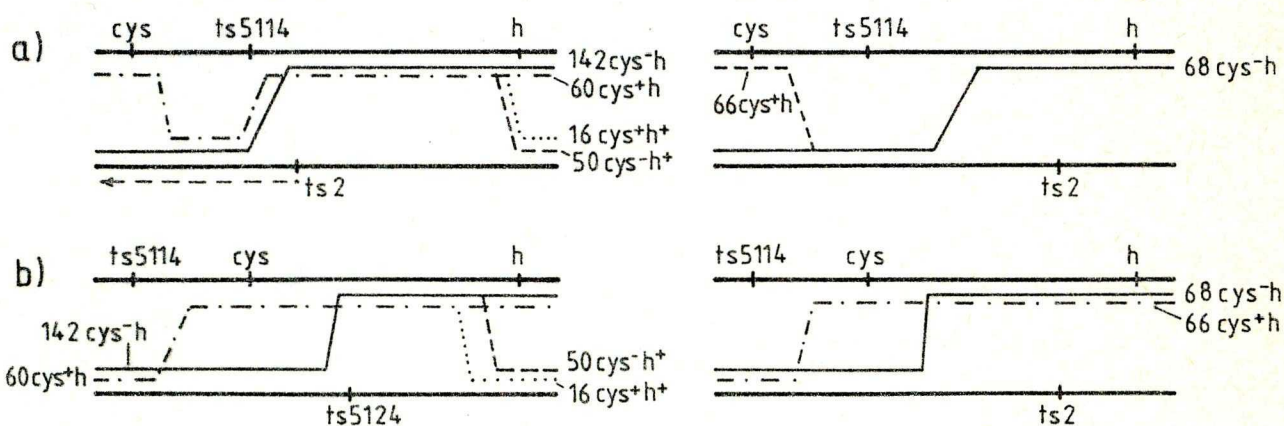
ködik: a ts2 és h markerek erős kapcsoltsága mutatja, hogy ts2 közel található a farki rost mutáció helyéhez, a cys 46 allél pedig már eléggé távol helyezkedik el a kromoszómán ahhoz, hogy kettős kromoszóma átkeresztződés (illetve a vándorló Holliday keresztthidak abban a régióban történő megoldódása) révén 1/4 részben cys^+h vad típusú rekombinánsokat is kapjunk. S a ritka rekombináns kategóriák megjelenéséhez az előzőekhez képest még 1-1-gyel több crossing over szükséges. A 18. ábrán megtekinthetjük a szóban forgó elrendezést, és a különböző típusú rekombinánsok keletkezését.

Van két hőérzékeny (ts) mutánsunk, amelyeknek négy-

1. Kontroll keresztezés:



2. A ts5114 helyzete:



18. ábra. Meghatározandó ts mutációk elhelyezkedése a 16-3 bakteriofág genetikai térképén négyfaktoros keresztezésekben származó szegregációs adatok alapján

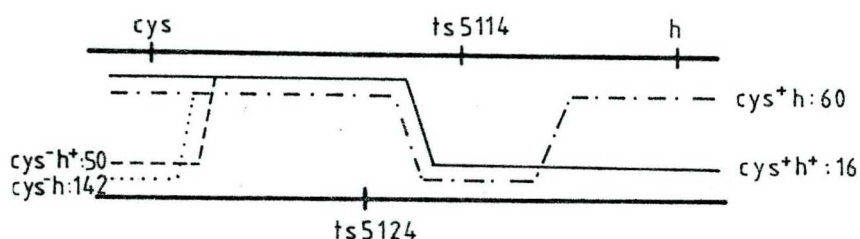
pontos keresztezéseit még nem értékeltük ki ($ts5114$ és $ts544$). Ezek a keresztezések annyiban különböznek a többitől, hogy itt a nem szelektív allélek reciprok elrendezésben vannak az előzőekhez képest. De ezekben az ese-

tekben is a keresztezések menete, a szelektálás és az egyedi plakkok (tarfoltok) tesztelése ugyanúgy történt, mint a többi fágtörzsek vizsgálatakor. Lássuk előbb a ts5114 esetét! Ezekben a keresztezésekben, mivel a nem szelektív allélok az "ismeretlen" ts mutációval vannak egy kromoszómán nem mondhatjuk abból, hogy ts^+ utódok nagy arányban h fenotípusúak azt, hogy a meghatározandó ts mutáns a h allél közelében van. Éppen ellenkezőleg, itt ebből csak azt állapíthatjuk meg - a ts2-vel elvégzett keresztezéséből -, hogy a ts2 van h közelében.

Azonban a vad rekombináns utódok nem szelektív allélek szerinti megoszlása jó útbaigazítást ad arra, hogy a kérdéses pontot - esetünkben a ts5114-et, illetve a későbbiekben a ts544-et - elhelyezzük a 16-3 fág genetikai térképén. Ha ugyanis a megoszlások alapján sorra vesszük a markerek által meghatározott régiókat, s minden egyes régióba megkíséreljük elhelyezni az adott ts mutációt, látni fogjuk, hogy nem sok lehetőségünk marad. A ts5114 mutációt, az ezt tartalmazó fág két keresztezéséből adódó adatok alapján két lehetséges helyre tehetjük a gén-térképen: a cys 46 alléltól balra, vagy pedig a cystein gén és a ts5124 pont közé. A 18. ábrán tanulmányozhatjuk a két legvalószínűbb elhelyezkedését a ts5114 pontnak, és a 6. táblázatban a rekombináns utódok megoszlását a



vele végzett kísérletekben. A többi régiókba (ts5124-ts2; ts2-h; illetve h-tól jobbra) nem helyezhetjük a ts5114 markert, mert azokban az esetekben a megoszlási arányok ellentmondanak keletkezésük lehetőségeinek. Például: ha a ts5114 pontot ts5124 és ts2 közé szeretnénk besorolni, nem tehetjük, mert abban az elrendezésben az adatok szerinti legkisebb rekombináns kategóriába tartozó utódok keletkezhetnének egyszeres crossing overral és a nagyobb arányban kapott rekombináns osztályok kétszeres és háromszoros átkereszteződéssel. Ez pedig nem lehetséges. Az elmondottakat a 19. ábra szemlélteti.

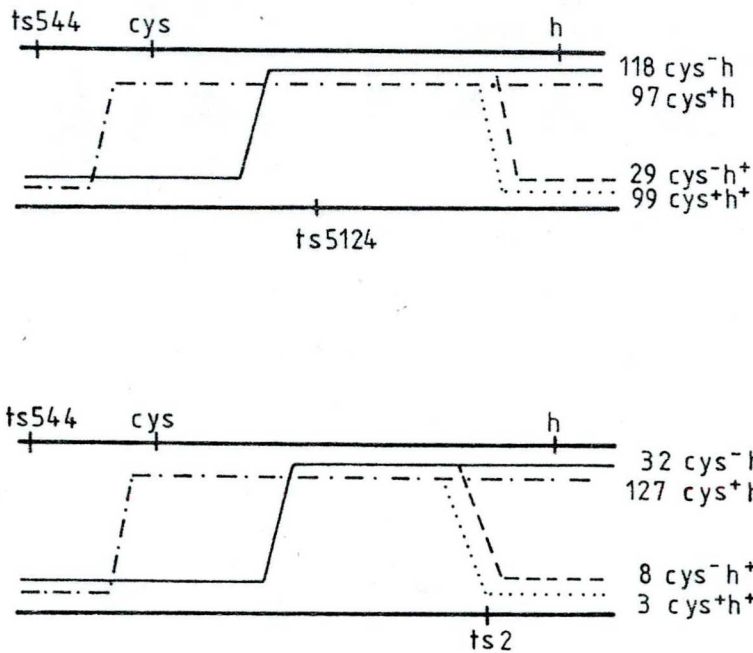


19. ábra. Példa egy ts pont helyetelen elhelyezkedésére a 16-3 fág genetikai térképén.

A ts5114 mutáns pontunkon keresztül azt szeretnénk megmutatni, hogy a négy pontos keresztezések szegregációs adatai alapján milyen ellentmondások merülnek fel, ha nem a megfelelő régióba soroljuk be az adott mutációt. Ezen esetben: a legkisebb rekombináns osztály keletkezne egyszeres crossing overral, és a legnépesebb háromszorossal. Ez lehetetlen!

Végül pedig néhány szót még az utolsó ts544 mutáns-sal végzett keresztezéseinkről!

Ezek az előző, ts5114-gyel végzett keresztezéshez hasonlatosak abban, hogy itt is a meghatározandó ts mutáns hordozza a nem szelektív allélpárt is. Így nem lehet a megoszlási eredményekből itt sem közvetlenül valamelyik nem szelektív markerrel való kapcsoltságot észlelni. Ha azonban - ahogy már az előző mutánsnál leírtam - sorra vesszük az ismert mutációk által kijelölt egyes régiókat, és megkíséreljük elhelyezni azokban a vizsgált mutációkat, akkor jól le tudjuk szűkíteni, be tudjuk határolni a mutáns pont helyét. A ts544 így csupán egy régióba sorolható be, és e helyzete nincs alapvető ellentmondásban egyik keresztezés megoszlási arányaival sem. Egy probléma azért van itt is, tudniillik az, hogy hogyan keletkezhet egy egyszeres és egy kétszeres kromoszóma átkereszteződéssel (ahol a kétszeresben az egyiknek az előző egyszeres régiójában kell lennie) ugyanolyan számú rekombináns fág. A legvalószínűbb elhelyezést a ts544-es pontra a 20. ábra szemlélteti.



20. ábra. A ts544 mutáció elhelyezése a négyfaktoros megoszlási adatai alapján

V.4. Marker rescue kísérletek

A vizsgált ts mutációinkat mostmár többé-kevésbé megnyugtatóan el tudtuk helyezni a 16-3 fág genetikai térképén, s egyre sürgetőbb volt ezeknek - illetve a fizikailag nem azonosított, de genetikailag jól meghatározott tesztelő mutációknak - a fizikai meghatározása is a kromoszómán. Nemcsak a 16-3 fágból kialakítandó vektor miatt volt ez fontos, de azért is érdekessé vált, mert az eddigi eredményeink (a három- és négyponos keresztezési adatok) összehasonlításából volt olyan halvány sejtésünk, hogy a 16-3 fág-kromoszóma kör alakban rekombinálódik, bár erre jó kísérleti eredményünk nem volt.

A markerek fizikai helyzetének megállapítása ebben, a rekombináció mechanizmusára vonatkozó megállapítás tisztázásában is segíthet. A cys 46 allél fizikai helye adott volt, mivel ezt a bakteriális gént transzdukáló fágként hordozzák a 16-3 származékok. Ez az allél tehát a fág bakteriumba történő beépülésének helyéhez - az attP -hez, helyesebben a hibrid attP-attB-hez - kapcsolódva helyezkedhet el, kiejtve a fágban eredetileg benne lévő ugyanakkora (kb: 6 kb) nagyságú fág-kromoszóma részletet. A többi markereket és az általunk elhelyezett ts mutációkat kellett tehát meghatároznunk a fág fizikai térképén.

Ezt a feladatot a következőképpen oldottuk meg: hogy az egyik fontos markerünket, a h-t (az egyik nem szelektív allélunk volt a keresztezésekben) is tudjuk fizikailag azonosítani ti3h6 fágból származó DNS-t klónoztunk pSUP106 plazmid vektorba. A vektor rajza látható a 10. ábrán. Azért választottuk ezt a vektort, mert jól lehet szelektálni rá, jól el lehet különíteni az eredeti és a rekombináns (16-3 ti3h6 fágfragmentumot hordozó) plazmidot tartalmazó baktérium sejteket egymástól (a Tc^R gén megnyilvánulása alapján). Könnyen mobilizálható, vihető E. coliból Rhizobiumba és viszont, és előnye még az is, hogy aránylag kicsi (9,9 kb) és a nagy fragmentumok, illetve több összeligálódott fragmentum is klónoozható

bele anélkül, hogy bevitele a baktériumsejtbe nehézséget okozna. Elkészült a "génbankunk", s az egyes klónok azonosítása után kiderült, hogy a ti3h6 kromoszómát a két legnagyobb BamHI fragmentum (az A és a B) kivételével a klónok teljes egészében tartalmazzák: többnyire egyedi BamHI fragmentumok vannak az egyes klónok plazmidjaiba beépülve, csupán három klónunk tartalmaz két-két fragmentumot együtt (a pPZS5: az F és N-et, és a pPZS186: a D és H-t és a pPZS6, illetve 167: az SM-et). Az elmondottakhoz az áttekintés megkönnyítése céljából ajánlom a 12., 13. ábrákat.

Az új klónjainkon kívül rendelkezésünkre álltak még más, nagyobb 16-3 fág DNS darabokat tartalmazó klónok is, amelyeken marker rescue kísérleteket végezhattunk. Ezek a pDH jelzésű, ti3 EcoRI fragmentumokat tartalmazó klónok, amelyeket Dorgai László és Hermes Edit állított elő 1983-ban. Az általunk használt pDH klónokat is láthatjuk a 13. ábrán.

Olasz Ferenc munkatársammal együtt először az imént említett pDH klónokon végeztünk marker rescue kísérleteket (ezek technikai leírása az "Anyagok és módszerek" című fejezetben szerepel). Három pDH klónt használtunk: a pDH31-et a pDH51-et és a pDH216-ot - illetve a tesztelő fágok fizikai helyzetének meghatározásához még a pDH1-et

is. Ez a négy klón együtt a fágkromoszóma 3/4 részét tartalmazza. Ezeknek a marker rescue eredményeknek az összefoglalása a 7. táblázatban található.

7. táblázat

Fágtörzsek	Reverzió Rm41-en 36°C		Rm41/pDH31		Rm41/pDH51		Rm41/pDH216		Rm41/pDH1 komplementáció	
	híg. db		híg. db		híg. db		híg. db			
ti4 ts2	-3	26	-8	94	-7	264	-3	18	+	
ti4 ts5	-3	0	-8	647	-8	285	-3	0	+	
ti3 ts5124	-3	92	-7	322	-5	10	-5	93	-	
ti4 ts4	-3	0	-5	532	-5	0	-3	0	-	
ti4 ts216	-3	2	-5	0	-5	0	-5	118	-	
			-7	0	-7	0				
ti4 ts411	-3	171	-7	103	-5	0	--		-	
			-7	0	-7	0				
ti4 ts5107	-3	49	-5	458	-8	614	-3	407	-	
ti4 ts5113	-3	0	-7	50	-5	179	-5	0	-	
ti4 ts5121	-3	0	-7	66	--		-5	72	-	
ti4 ts5215	-3	0	-7	63	-5	32	-5	0	-	
ti4 ts5231	-3	3	-7	1416	-5	0	-3	0	-	
			-8	74						
ti4 ts5245	-3	3	-7	2546	-7	0	-3	19	-	
ti4 ts5255	-5	0	-5	8	-5	0	-5	0	-	
ti4 ts5260	-3	182	-7	345	-7	28	-3	208	-	
ti4 ts5330	-3	0	-7	1442	-3	472	-3	0	-	
ti4 ts5334	-3	1	-8	53	-5	44	-5	0	-	
ti4 ts5335	-3	0	-7	938	-5	85	-3	0	-	
ti4 ts5336	-3	3	-7	2460	-7	vannak	--		-	

Magyarázat: --: nem vizsgált

-: nem volt komplementáció

+: volt komplementáció (a revertáns titer fölött több nagyságrenddel)

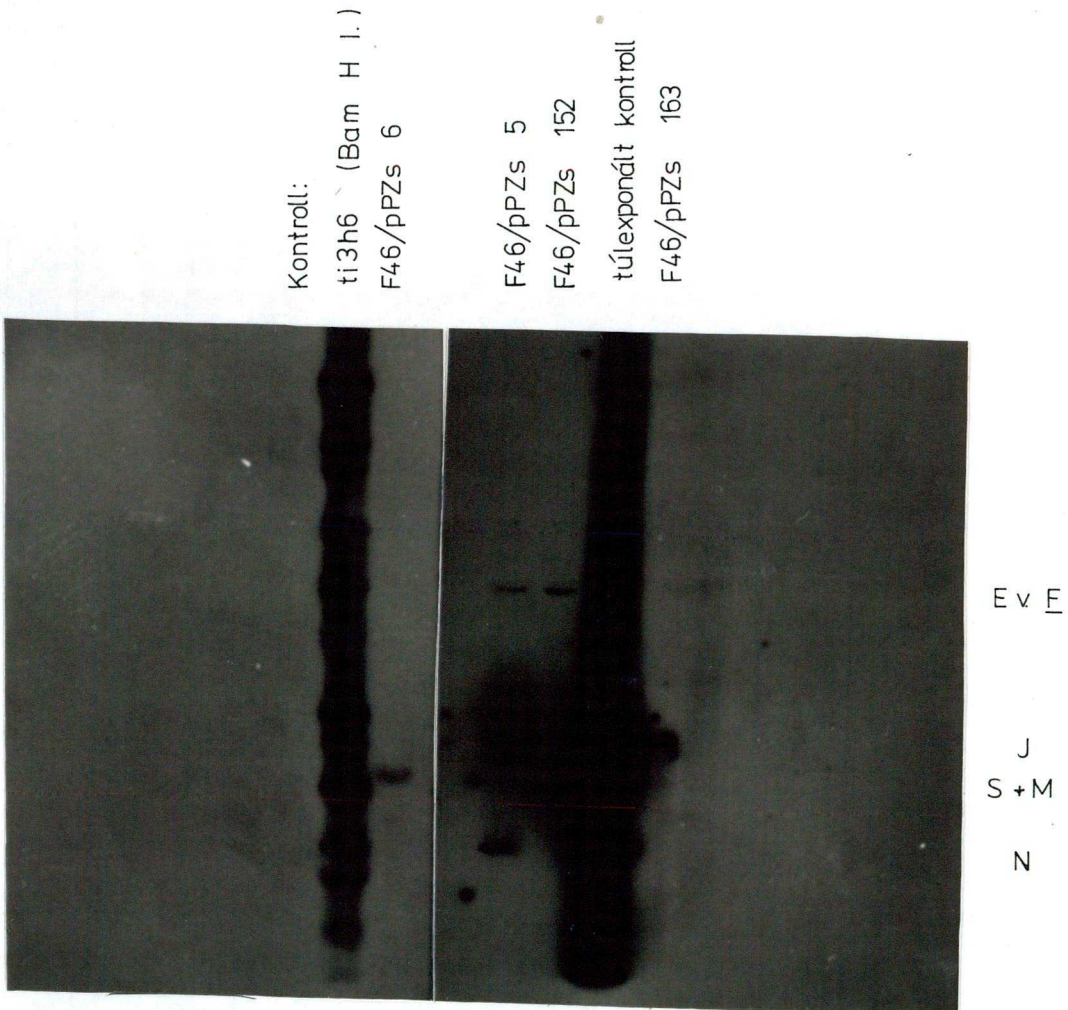
A 7. táblázatból megállapíthatjuk, hogy a ts2 tesztelő fág a pDH31, a pDH51 és a pDH1 klón átfedő területén kell, hogy legyen (a fág EcoRI O,C vagy D fragmentumában), s itt található a ts5 is, amely szintén egy, a genetikai térképen pontosan elhelyezett mutáció (nagyon közel h⁺ markerhoz). A másik tesztelő fágunk, a ts5124 szintén három pDH klón, de nem ugyanazok, hanem a pDH31, pDH51 és pDH216 átfedő fragmentjeinek (EcoRI: M,EI) valamelyikében helyezkedik el. A meghatározandó ts mutánsok közül volt egy, a ts5255 a sorozat vizsgálatban használt egyik pDH klónnal sem komplementált - tehát várhatóan egyik területére sem esik. A vizsgáltak közül két ts mutáció: a ts5107 és a ts5260 mindhárom általunk használt pDH klónnal adott ts⁺ utódokat, tehát átfedő területükön kell lenniük (EcoRI: M, EI). Vannak két klónnal komplementáló ts fágjaink: a pDH31-gyel és 51-gyel a ts5113, a ts5215, a ts5330, ts5334, a ts5335 és a ts5336 komplementál. Ezek a mutációk, így a fág kromoszóma EcoRI M,E-I,O,C,D fragmentjeinek területén található (ez azonban egy hatalmas, 23 kb-nyi terület!) A pDH31-gyel és a pDH216-tal a ts5121 ad ts⁺ utódokat, tehát a mutáció a fág DNS EcoRI M, E-I fragmentum területére esik. S voltak olyan hőérzékeny mutánsaink is, amelyek a vizsgálatainkban egyetlen pDH klónnal komplementáltak. Ilyenek: ti⁴ts4, ti⁴ ts216, ti⁴ ts5231. A ts4 és a ts5231 a pDH31-gyel volt képes vad fenotípust mutatni,

a ts216 a pDH216-tal. Azonban meg kell jegyezni, hogy a ts4 és a ts5231 esetében a pDH51-es klónon végzett kísérletben, a ts216 esetén pedig a pDH31-es és a pDH51-es klónokon nem zárható ki teljes biztonsággal a komplementáció, mivel a kapott negatív értékeinket nem a reverzió titerének megfelelő hígításban kaptuk. A fennmaradó két mutánsról hiányosak az adataink, így csak a következőket állapítottuk meg: a ti4 ts5245 nem komplementál pDH216-tal, de nagyon erősen komplementálja a pDH31-es klón (ebből a fág kromoszóma EcoRI: O,C,D,L valamelyikén kell lennie). A ti4 ts411-ről elég keveset tudunk meg ebből a táblázatból, csak annyit, hogy az eléggé nagy 16-3 ti3 DNS-t tartalmazó pDH31 klón fág fragmentjei területére eső mutáció.

Minthogy láthattuk, a pDH klónokon vágzott marker rescue kísérletek csak eléggé durva fizikai behatárolását tették lehetővé a ts mutánsainknak (hiszen a kapott legkisebb távolság - amelyen belül helyezendő el egy-egy meghatározandó mutáció - is közel 10 kb, nem is beszélve a sokkalta nagyobb kromoszóma szakaszokról), ezért is volt szükséges, hogy kisebb fág DNS fragmentumokat tartalmazó más klónokon is végezzünk hasonló kísérleteket. Újonnan előállított pPZS klónjaink sokkal kisebb fág DNS darabokat hordoznak, így ezeken folytattuk további marker rescueinkat. A szóban forgó klónokban található BamHI fragmentumokat a 13. ábrán tüntettük fel. A klónjainkat ezekhez a

kísérletekhez át kellett konjugáltatnunk az eredeti HB101 sejtekből Rhizobium sejtekbe. Sikerült F46 (cys 46⁻) baktériumba átvinnünk a pSUP106 plazmidot a benne levő megfelelő 16-3 DNS darabokkal. Ezt a mikrobiális ellenőrzés is mutatta, s néhány klónunk esetében DNS-DNS hibridizálással is bizonyítottuk. (Lásd 21. ábra.)

A pPZS klónokkal elvégzett komplementációs marker rescuek eredményeit a 8. táblázatban összegeztük. A táblázatot figyelve a következő dolgok tűnnek fel: komplementációs marker rescue alapján sikerült fizikailag azonosítani néhány ts mutánsunkat. A fág BamHI F vagy N fragmentuma területére esik a ts2 (ez különösen fontos mutáció volt számunkra, hiszen ez szerepelt az egyik tesztelő fágunkban a keresztezéseink során), a ts5, a ts5104 és a ts5245. Ezek az eredmények nincsenek ellentmondásban a mutációk genetikai térképen elfoglalt helyével, ugyanis a ts2 és a ts5 egymás közelében található, s a két újonnan meghatározott mutáció is elhelyezhető ennek a képnek megfelelően. A ts2 valószínűleg a 16-3 fág BamHI F fragmentjében van, kaptunk ebben a rendszerben ts⁺ fenotípusú fágokat (az eredményt azért kérdőjeleztük meg, mert nincs meg egészen az e kísérleteinknél kívánatos legalább két nagyságrendnyi különbség a revertánsok számához viszonyítva). A 16-3 kromoszóma jobb karjára is kaptunk komp-



21. ábra. Az F46 baktériumba átkonjugáltatott klónok azonosítása, jelenlétük igazolása DNS-DNS hibridizáció segítségével.

8. táblázat

A komplementációs marker rescue eredmények összefoglalása

Fágtörzsek	F46/pPZS192 BamHI:C	F46/pPZS191 BamHI:D	F46/pPZS164 BamHI:E	F46/pPZS152 BamHI:F	F46/pPZS161 BamHI:H	F46/pPZS163 BamHI:J	F46/pPZS186 BamHI:D,H	F46/pPZS5 BamHI:F,N	F46/pPZS6 BamHI:SM
ts2		-	-	+(?)	-	-		+++	-
ts5		-	-	-(?)		-		+++	-
ts6								-	
ts518		-			++			-	
ts544	-				-	-		-(?)	+
ts5104		-	-					+++	-
ts5113		-		-				-	
ts5114		++			-				-
ts5115									+
ts5124					+(?)		+(?)		-(?)
ts5245				-				++	
ts5330				-				-	
ts5336				-				-(?)	

Magyarázat: Van komplementáció: +

Nincs komplementáció: -

Az üres kockák a nem vizsgált eseteket (vagy/és a nagy reverzió miatti sikertelen kísérleteket) jelölik.

komplementációt két esetben biztosan. Ezek a ts518 és a fág BamHI: H fragmentuma, illetve a ts5114 és bakteriofágunk BamHI: D fragmentuma közötti komplementáció, melynek

alapján a ts518 a fág BamHI emésztésének H_a ts5114 allélje a D fragmentje területén kell, hogy legyen. Van még a jobb karra egy bizonytalan adatunk, a ts5124 mutáció talán a 16-3 fág BamHI H fragmentumában van, a komplementációs rescue kísérletek mutattak némi (szűk 2 nagyságrendnyi) komplementációt ez esetben, de ezt rekombinációs marker rescueban megismételve nem kaptunk reverzió fölötti ts⁺ rekombinánst. További két mutánsunk mutatott még komplementációt, méghozzá az ún. ragadós véggel (BamHI: SM kettős fragmentum). Ide a ts544 és a ts5115 jelű mutációk esnek. A kapott eredmények ez esetben sem meglepőek, sőt összecsengenek a genetikai eredményekkel.

Azonban nemcsak komplementációs marker rescue kísérleteket végeztünk, hanem rekombinációs marker rescue-t is. Először az egyik legfontosabb markerünk a h (nem szelektív allél volt a keresztezéseinkben) fizikai meghatározását tekintjük át! (A rekombinációs marker rescue kivitelezésének leírása az "Anyag és módszer" című fejezetben megtalálható.) Az F46 baktériumon szaporított fág volt az összehasonlítási alap, míg a megfelelő klónon (F46/pPZS5) szaporított fág rekombinációval hozzájárult a h markerhez, amelynek valószínű jelenlétét a fág-kromoszómában rezisztens baktériumon történő tit-

rálás mutatta meg. A 9. táblázatban láthatjuk ezeket az eredményeket:

Fágtörzs	Kontroll rescue F46-on Titrálás				Marker rescue F46/pPZS5(F,N)-ön Titrálás			
	F46-ra		F46 ^R 10-re		F46-ra		F46 ^R 10-re	
	H	Á	H	Á	H	Á	H	Á
ti4 ts2	-7	53	-1	0,5	-7	76	-2 -3	216,5 50

Magyarázat: H: hígítás

Á: átlagos db szám

Az eredmények magukért beszélnek: a rezisztens baktériumon kapott három nagyságrend különbség a kontroll baktériumon és a pPZS5-ös klónon szaporított fágok száma között bizonyítja, hogy a h markerünk a fág BamHI: F és N fragmentumának valamelyikén helyezkedik el. Megjegyezzük, hogy mivel ezt a kísérletet ti4 ts2 fággal végeztük, és a fágrezisztens baktériumon szaporodó bakteriofágokból néhányszor tízet egyenként teszteltünk, vajon ts vagy ts⁺ fenotípusúak-e, valószínűsíthettük, hogy a h és a ts2 mutációk (a BamHI: F és N közül) különböző fragmentumokon helyezkednek el. Ugyanis a vizsgált h fenotípust mutató fágok közül elenyésző hányad volt egyben ts⁺ rekombináns is.

Végeztünk még rekombinációs marker rescuekat ts518-ra

és ts5124-re is. A ts5124 esetét már megemlítettem, tudniillik azt, hogy az ilyen módon kapott eredmény nem erősítette meg a ts5124 BamHI:H fragmentbeni jelenlétét. De tudjuk azt (Orosz László pEH109-en; Dorgai László, Olasz Ferenc és a magam pDH klónokon - 1; 31; 51; és 216 - kapott eredményei alapján - 7. táblázat), hogy ts5124-nek nagy valószínűséggel a fág-kromoszóma jobb karján vagy a bal kar végén kell lennie. Méghozzá a fág-kromoszómának az EcoRI:M illetve E-I fragmentjei területén. A ts518-cal végzett rekombinációs rescue - F46/pPZS161-en megerősítette a komplementációsan kapott eredményeket, szűk két nagyságrendnyi ts^+ rekombinánst mutatván a kontrollhoz képest, és végeredményben azt, hogy a ts518-as mutációnk a 16-3 BamHI:H fragmentumának területére esik.

Volt még egy harmadik vizsgálati módszerünk is, amelyet a pPZS156-os klónunkon történő vizsgálatok megvalósítása céljából kellett kidolgoznunk. Ugyanis ez a klón 36 °C-os hőmérsékleten, amelyen a vad rekombinánsokra szelektálunk, elpusztul. Ez a rekombinációs marker rescue gyorssteszt (leírása az: "Anyagok és módszerek" fejezetben található). Ennek alapján első lépésben úgy találtuk, hogy a következő ts mutációk esnek a fragmentum területére: ts6. ts5113. Ezeket az eredményeket ellenőriztük "valódi" folyadékkultúrában végzett rekombinációs rescueval. Az eredmény így is pozitívnak mondható. Az

adatokat a 10. táblázatban találjuk meg:

10. táblázat

Fágtörzsek	Kontroll		F46-on		Rekombinációs rescue F46/pPZS156(G)-on			
	28 ⁰		36 ⁰		28 ⁰		36 ⁰	
ts6	-6	373,5	-3	113,0	-5	25	-3	1250
ts5113	-6	242	-2	0	-6	12	-2	19
ts518	-6	87	-3	11	-6	14	-3	2
ts5115	-6	75	-3	0	-6	49	-3	0
ts544	-6	415	-2	0	-6	738	-2	0
ts5336	-6	46	-1	0	-6	286	-1	0

Magyarázat: Minden rubrika bal oldalán a hígítási érték szerepel, jobb oldalán a kapott fágok átlagértéke a hozzá tartozó hígításban.

A két említett - valószínűleg a fág BamHI:G fragmentumában található - ts fág (ts6, ts5113) kívül a táblázatban szereplő további négy ts mutáns nem adott ts⁺ rekombinációkat az a klón által hordott fág-fragmentummal, tehát fizikai helyük nem itt van. Ez közülük háromról: a ts518-ről, a ts544-ről és a ts5115-ről ki is derült (a kísérletek időrendje szerint később), ezt már a komplementációs marker rescuek között megmutattam.

V.5. Megjegyzések

Érdekesnek tartom, és ezért a dolgozatban is említésre méltónak találtam három pPZS klónom viselkedését.

Az egyikről már tettem említést az előző alfejezetben. A pPZS156 klón, amely a fág BamHI:G fragmentumát tartalmazza Rhizobiumban 36 °C-on nem életképes, 28 °C-on azonban "vígán" szaporodik. Valami olyan fágfunkció található benne, amely a hőmérséklet növekedésével (vagy ilyen, magasabb hőfokon) aktiválódik .

Másik két klónom: a pPZS163 (BamHI:J) és a pPZS164 (BamHI:E) igen kénkeservesen tartható fenn Rhizobiumban, E. coliban nem volt gondom velük. A telepek - az a nagyon kevés is, ami felnő - rövid idő alatt elfolyósodnak, az egyik áttetszőbbé is válik. Úgy gondoljuk, hogy e két klónban található 16-3 fág fragmentumok egy-egy a fág lízis funkciójával kapcsolatos gént hordozhatnak, amelyek Escherichia coliban nem nyilvánulnak meg.

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Most már, hogy végigtanulmányoztuk a különböző kísérletekből származó eredményeket, összegezhethetjük, hogy milyen következtetésekre jutottunk ezekből.

Meghatároztuk jó pár eddig ismeretlen ts mutáció helyét a 16-3 fág genetikai térképén (ezeket már a Kísérleti eredmények fejezetben részleteztük - ábrák), ezek közül tíz ts mutánsnak a fizikai helyét is elég pontosan meghatároztuk - a ts5124-et 10 kb-nyi, a ts2 - t és a többieket 5 kb-nyi fág-kromoszóma területen belül. Behatároltuk a h mutációt tartalmazó farki rost gén helyét is a 16-3 fág kromoszómájának bal karján (részletebben lásd az előző fejezetben) 5 kb-nyi pontossággal. Megállapítottuk, hogy a mutánsok genetikai és a fizikai elhelyezése nem mond ellent egymásnak egy esetben sem.

A genetikai térképezési kísérletekből származó adatok lineáris géntérképet eredményeztek a régebbi vizsgálatok alapján (Orosz L. 1972: kandidátusi értekezés; Orosz és mtsai 1973; Orosz L. 1982: akadémiai doktori disszertáció), s ezt a helyzetet nem változtatta meg további ts mutációk térképezése sem. Minden vizsgált ts mutánsunkat el tudtuk helyezni a fág-kromoszóma lineáris

genetikai térképén. Ez adódhat abból, hogy a fág-fehérléket megjelölő ts mutációink meglehetősen tömörülve helyezkednek el a 16-3 fág kromoszómáján (erről már az Irodalmi bevezetőben is szóltam). A transzdukáló cys 46 allél, a korai és kései ts mutációk között nagy a fizikai távolság - amelyet nagyjából a térképezési adatok az előzőleg mért rekombinációs gyakoriságok is tükröznek -, és így a nagy távolságok miatt egy egyébként cirkuláris (kör alakú) géntérkép is lineárisként mutatkozhat. Azért írtam azt, hogy a távolságokat a genetikai térkép nagyjából, hozzávetőleg (nem pontosan!) tükrözi, mert a fizikai távolság például a cys 46 allél és ts5124 között még nagyobb, mint ami a genetikai térképről a rekombinációs eredmények alapján várható lenne. A nagyobb távolságot valószínűleg az avir T mutáció közelében tapasztalható nagyobb rekombinációs aktivitás ellensúlyozza - teszi a géntérképen kisebbé ebben az esetben.

A mutációk fizikai helyzetének figyelembe vételével azt kell mondanunk, hogy az eddigi csendes régió elhelyezkedése megváltozott, a 16-3 fág-kromoszóma bal karjáról a kromoszóma közepére tolódott. Nagysága azonban alig változott. A mostani fizikai elhelyezés azt mutatja, hogy a fág bal karján találhatóak a kései fágfunkciók génjei, a kromoszóma jobb karjának utolsó negyedében a

koraiak. Ez az elrendezés úgy lehetséges, ha feltételezzük, hogy a fágunk rekombinációja kör alakban zajlik.

A bakteriofág fizikai végei nem jelentenek egyben rekombinációs végpontokat is. Az eddigi eredményekből az is lehetséges, hogy a 16-3 fág nem λ -szerű pakolódást mutat, s hogy rekombinációs mechanizmusa - legalábbis részben - eltér az eddig ismert mérsékelt fágokétól.

A mechanizmus megnyugtató felderítéséhez azonban még sok kísérletre van szükség, például különböző rekombinációs működésükben hibás fágok keresztezésére, hogy eldönthető legyen melyik rekombinációs rendszer játszik főszerepet e fág-kromoszóma kicserélődési folyamataiban, s az egyes funkciók hibái hogyan és miként befolyásolják a különböző rekombinációs keletkezését. Valamint az egyes rekombinációs funkciók biokémiai jellemzését is meg kell adnunk.

Egy dolog azonban már most is bizonyos, hogy a 16-3 fág az e dolgozatban tárgyalt eredmények alapján genetikai elrendezésében, a genetikai és fizikai térkép megfelelésében, kromoszómája szerveződésében tökéletesen más, mint az E. coli fágjai, még a λ fágtól is igen különböző ezekben, noha külső felépítésükben, sőt struktúrafehérjéik elrendezésében is nagyon hasonlóak.



IRODALOMJEGYZÉK

- ADAMS, M. 1959: Bacteriophages. Interscience Publisher Inc. New York.
- BOLIVAR, F., RODRIGEZ, R., GREENE, P., BETLACH, M., HEYNEKER, H., BOYER, H., CROSA, J., FALKOW, S. 1977: Gene 2: 95-113. Construction and racterization of new cloning vehicles, II. A multipurpose cloning system.
- BOYER, H.B., ROULLAND-DUSSOIX, D. 1969: J. Mol. Biol. 41: 459-472. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in E. coli
- BROKER, T.R., DOERMANN, A.H. 1975: Ann. Rev. Gen. 9: 213-244. Moleculer and genetic recombination of bacteriophage T4.
- CAMPBELL, A.M. 1962: Adv. Genet. 11: 101. Episomes
- CANNON, F.C., RIEDEL, G.E., AUSUBEL, F.M. 1977: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2963-2967. Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation (nif) gene cluster of Klebsiella pneumoniae.
- DALLMANN G., OROSZ L., SAIN B. 1979: Mol. Gen Genet. 176: 439-448. Restriction mapping of DNA of temperate Rhizobium meliloti phage 16-3; Comparison of genetic and physical maps indicates a long genetically silent chromosomal arm.

- DALLMANN G. 1979: Doktori értekezés, JATE. A Rhizobium meliloti 16-3 fág kromoszóma térképezése restrikciós endonukleázokkal.
- DALLMANN G., OROSZ L. 1980: Mol. Gen. Genet. 178: 443-446. Virulent mutants of temperate Rhizobium meliloti phage 16-3: Loci avirC and avirT and increased recombination.
- DORGAI L., OLASZ F., BERÉNYI M., DALLMANN G., PÁY A., OROSZ L. 1981: Mol. Gen. Genet. 182: 321-325. Orientation of the genetic and physical map of Rhizobium meliloti temperate phage 16-3.
- DORGAI L., POLNER G., JÓNÁS E., GARAMSZEGI N., ASCHER Z., PÁY A., DALLMANN G., OROSZ L. 1983: Mol. Gen. Genet. 191: 430-433. The detailed physical map of the temperate phage 16-3 of Rhizobium meliloti 41.
- DRESSLER, D., POTTER, M. 1982: Ann. Rev. Biochem. 51: 727-761. Molecular mechanisms in genetic recombination.
- HANAHAN, D. 1983: J. Mol. Biol. 166: 557-580. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.
- HENDRIX, R.W., ROBERTS, J.W., STAHL, F.W., WEISBERG, R.A. 1983: Lambda II.
- HOWARD-FANDERS, P., WEST, S.C., STASIAK, A. 1984: Nature 309: 215-220. Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination.

- KONDOROSI Á., KISS GY., FORRAI T., VINCZE É., BÁNFALVI ZS.
1977: Nature 268: 525-527. Circular linkage map
of *Rhizobium meliloti* chromosome.
- MANIATIS, T., FRITSH, E.F., SAMBROOK, J. 1982: Molecular
cloning. A laboratory manual. CSHL.
- MATHEWS, C.K., KUTTER, MOSING, G., BERGET, P.B. 1983:
Bacteriophage T4.
- NIGEL, G., VAPNEK, D. 1973: Bioch. et Bioph. Acta Amsterdam
299: 516-520. A simple method of preparing large
amounts of ϕ x 174 RFI supercoiled DNA.
- OLASZ F. 1983: Doktori értekezés: *Rhizobium meliloti* repair
és rekombinációs rendszerének vizsgálata.
- OLASZ F., DORGAI L., PÁY A., OROSZ L. 1983: Mol. Gen. Gen.
191: 393-396. Recombination deficient mutants
of *Rhizobium meliloti* 41.
- OLASZ F., DORGAI L., PAPP P., HERMESZ E., KÓSA E., OROSZ L.
1985: Mol. Gen. Gen. 201: 289-295. On the site
specific recombination of phage 16-3 of *Rhizobium*
meliloti: identification of genetic elements and
att recombinations.
- OROSZ L., SVÁB Z., KONDOROSI Á., SÍK T. 1973: Mol. Gen.
Genet. 125: 341-350. Genetic studies in *Rhizo-*
biophage 16-3 I. Genes functions on the chromoso-
me.

- OROSZ L., SÍK T. 1970: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.
17: 185-194. Genetic mapping of Rhizophage 16-3.
- OROSZ L. 1972: Kandidátusi értekezés. Bakteriofág kromoszóma genetikai elemzése.
- OROSZ L., ROSTÁS K., HOTCHKISS R. 1980: Genetics 94: 249-263. A comparison of two point, three point and deletion mapping in the C cistron of Rhizobiphage 16-3 and an explanation of the recombination pattern.
- OROSZ L. 1980: Genetics 94: 265-276. Method for analysis of the C cistron of temperate phage 16-3 of Rhizobium meliloti.
- OROSZ L., PÁY A., DALLMANN G. 1980: Mol. Gen. Gen. 179: 163-167. Heterozygosis of phage 16-3 of Rhizobium meliloti: Moderate level of mismatches repair or gene conversion.
- OROSZ L. 1982: Akadémiai doktori értekezés. A Rhizobium meliloti 41 mérsékelt bakteriofág molekuláris genetikája.
- ÖRDÖGH F., SZENDE K. 1961: Acta Mikrobiol. Acad. Sci. Hung.
7: 65-71. Temperate bacteriophages isolated from Rhizobium meliloti.
- PÁY A. 1984: Egyetemi doktori értekezés. Rekombinációs vizsgálatok egy fág kromoszómán in vivo és in vitro.

- SIMON, R., PREIFER, U., PÜHLER, A. 1983: Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of gram-negative bacteria. In book: Molecular genetics of the bacteria-plant interaction.
- SOUTHERN, E.M. 1979: Method in Enzymology 68: 152-176. Gel electrophoresis of restriction fragments.
- STAHL, F.W. 1979: Genetic recombination. Thinking about it in phage and fungi. W.H. Freeman and Co.
- STAHL, F.W., STAHL, M.M. 1974: Genetics 131: 27-30. Molecular and General. A role for recBC nuclease in the distribution of crossovers along unrepliated chromosomes of phage λ .
- STREISINGER, G., EMRICH, J., STAHL, M.M. 1966: Proc. Nat. Ac. Sci. USA 57: 292-295. Chromosome structure in phage T4, III. Terminal redundancy and length determination.
- STREISINGER, G., EDGAR, R.S., DENTRARDT, G.M. 1964: Proc. Nat. Ac. Sci. USA. 51: 775-779. Chromosome structure in phage T4, I. Circularity of the linkage map.
- SVÁB Z., KONDOROSI Á., OROSZ L. 1978: J. Gen. Microbiol. 106: 321-327. Specialised transduction of a cystein marker by Rhizobium meliloti phage 16-3.
- VISCONTI, N., DELBRUCK, M. 1953: Genetics 38: 5. Mechanism of genetic recombination phage.

WEISBERG, R., ENQUIST, L., FOELLER, C., LANDY, A. 1983:

J. Mol. Biol. 170: 319-342. A role for DNA
homology in sitespecific recombination: The
isolation and characterization of a site-affi-
nity mutant of coliphage λ .

WHITEHOUSE. H.L.K. 1982: Genetic recombination (Under-
standing the mechanisms) John Wiley and Sons.

YAMAMOTO, K.R., ALBERTS, B.M., BENZINGER, R., LAWHORNE,

L., TREIBER, G. 1970: Virology 40: 734-744. Rapid bacterio-
phage sedimentation in the presence of polyethy-
lene glycol and its application to large-scale
virus purification.