

E G Y R N S P R O C E S S I N G E N Z I M

K L Ó N O Z Á S A

Készítette:

Dallmann Klára

Szeged

1986

KÖZDOLÁS



T A R T A L O M J E G Y Z É K

	old.
- Célkitűzések	1
- Irodalmi áttekintés	2
- Anyag és módszer	11
- Eredmények	21
- Összefoglalás	42
- Irodalomjegyzék	43

C É L K I T Ű Z É S E K

A riboszómális RNS processing egyik enzime az rne gén által kódolt RNáz E. A munka célja olyan plazmid klón előállítása volt, amely a teljes gént tartalmazza, és a klónt tartalmazó plazmid komplementálni képes az rne mutációt rec⁻ Escherichia coli törzsben.

Ez a cél a következő lépések megvalósítása során érhető el:

- A teljes rne gént tartalmazó klón izolálása Escherichia coli DNS-ből.
- Az rne gén hatásainak leszűkitése, különböző restrikciós enzimek felhasználásával készült deléciós fragmentek klónozása útján.
- Promóter helyzetének, polaritásának vizsgálata.
- A klónozott gén megnyilvánulása különböző gazdasejtekben.
- RNáz E protein méretének meghatározása E. coli minisejtekben, L-/³⁵S/ metioninnal történő jelölés útján.

I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

Riboszóma szerkezete, stabil RNS-ek érése

A prokarióta sejtek riboszómái két alegységből épülnek fel. Mindkét alegység egyaránt tartalmaz fehérjét és RNS-t.

A nagyobbik alegység /50S/ 23S rRNS-ből, 5S rRNS-ből és 34 specifikus riboszómafehérjéből tevődik össze, a kisebb alegység /30S/ pedig 16S rRNS-t és kb. 21 riboszómafehérjét tartalmaz.

Valamennyi rRNS egyszálú, azonban a szerkezeti kutatások során megállapítást nyert, hogy az RNS-en belül a bázisok egy része hasonlóan a tRNS-hez hidrogénkötésekkel párokba rendeződik, így egyszálas és kettős kelekális régiók váltják egymást a rRNS-en belül.

Az *Escherichia coli* sejtek 7 riboszómális RNS transzkripciós egységet tartalmaznak, amelyről a következő sorrendben íródnak át a rRNS-ek: 16S rRNS - 23S rRNS - 5S rRNS.

Ismert az a tény is, hogy a prokarióta gének közvetlen transzkripciós termékei nem azonosak a sejtben működő RNS molekulákkal. Mindegyik stabil RNS, mint pl.

a rRNS-ek és a tRNS-ek és néhány mRNS az E.coliban és ennek bakteriofágjában különbözik a gének elsődleges transzkripciós termékeitől. A működőképes RNS molekulák a prokarióta sejtekben négy típusú érési folyamat során jöhetnek létre; ezek a következők:

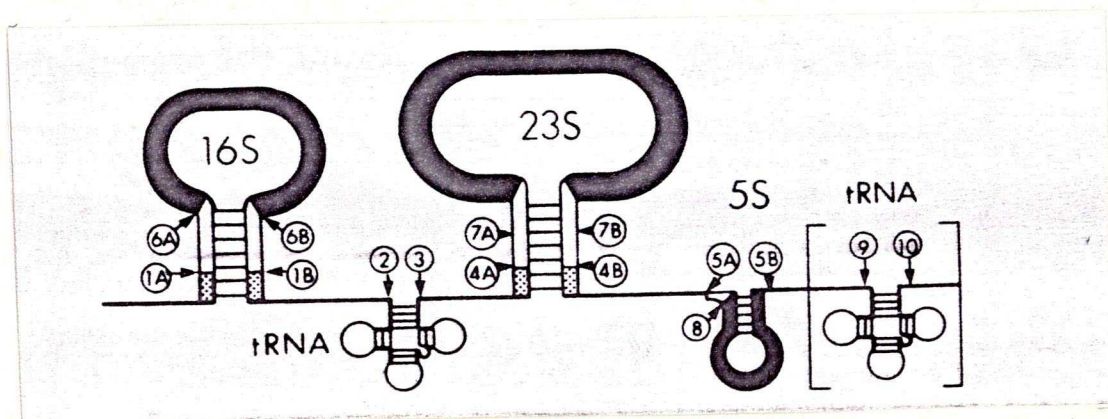
- a/ a policisztronos transzkripciós termék pontos elkülönítése monocisztronos RNS prekurzorokra.
- b/ 5' 3' végek pontos felismerése és az extranukleotidok eltávolítása
- c/ a terminális szekvenciák hozzácsolása az RNS-ekhez
- d/ bázisok vagy a ribóz rész módosítása az RNS láncban.

Nem mindegyik RNS molekula kialakulásához szükséges mind a négy érési folyamat /16/. Az utóbbi időben számos közlemény jelent meg, amely a stabil RNS-ek /25/ vagy a sejtekben található összes RNS kialakulásával foglalkozik /1, 30/ mind prokarióta mind eukarióta sejtekben, mások a rRNS-ek /29/ illetve tRNS-ek képződését írják le *Escherichia coli*-ban /2, 3, 13, 36/.

Riboszómális RNS processing vad típusú *Escherichia coli* sejtekben

Az RNS polimeráz molekula, amely elkezd a rRNS gén transzkripcióját, folyamatosan szintetizálja a policisztronos rRNS elsődleges transzkripciós termékeit.

A vezető szekvenciák tartalmazzák a pl6 rRNS-t, a középső rész tRNS-eket, a p23 rRNS-t és a p5 rRNS-t foglalja magában, a befejező rész pedig néhány operon esetében ismét tRNS-eket hordoz /1. ábra/ /6, 15/.



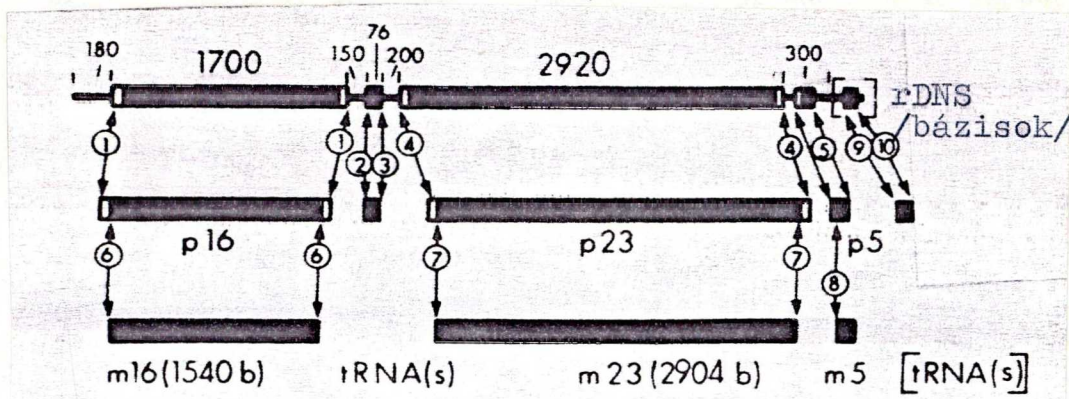
Hasítási helyek: 1,4. RNáz III, 2,9. RNáz P, 3,10. RNáz F, 5. RNáz E, 6. RNáz M16, 8. RNáz M5.

1. ábra. Az elsődleges rRNS transzkriptum szerkezete és a processingben résztvevő enzimek hasítási helyei.

Mielőtt a transzkripció befejeződne az endonukleázok már elkezdik a felszabaduló RNS lánc hasítását /2. ábra/ /6, 15/. Amint a polimeráz molekula megszintetizálja a pl6 rRNS-t a megfelelő komplementer szekvenciák összekapcsolódásával létrejön az 1. ábrán látható szerkezet, amelyből az RNáz III hatására kivágódik a pl6 prekurzor rRNS.

A középső régióból a szintézis során folyamatosan

felszabadulnak a tRNS-ek az RNáz F és RNáz P hatására.



2. ábra. Processing vad típusú sejtben. A hasítóhelyek számozása ugyanaz mint az 1. ábrán.

Amint az RNS polimeráz befejezi a 23S gén átírását, szintén az RNáz III működésbe lépése folytán felszabadul a transzkriptumból a p23 szekvencia.

A továbbiakban 5S gén termékeként képződő RNS lánc, amint felvette a megfelelő konformációt, az RNáz E enzim hatására p5 rRNS-é alakul. Az esetleg még képződő tRNS-eket az RNáz P hasítja ki.

A processing fent ismertetett lefolyását bizonyítja az a kísérleti megfigyelés is, amely szerint vad típusú sejtekben nem lehet kimutatni 25S RNS-t, amely a p23 és a p5 szekvenciákat tartalmazza, és nem fedezhető fel a 9S régió sem, amelynek része lenne a p5 /16/.

Ezek a tények arra utalnak, hogy az elsődleges processing hasítások az RNáz III és az RNáz E által igen gyorsan következnek be, valószínűleg a megfelelő szek-

venciák szintézise után másodperceken belül. rRNS operonon az RNS polimeráz 37 °C-on 85 nukleotid/sec sebességgel képes dolgozni /14/.

A távolság a p23 és p5 szekvenciák között 81 bázis, további 39 bázis található a p5 és a befejező szignál között abban a négy riboszómális RNS operonban, amelyek nem kódolnak a befejező részben tRNS-eket /39/.

A fő különbség a rRNS processingben a prokarióta és az eukarióta sejtek között abban található, hogy míg a prokarióta sejtek rRNS processingje gyakorlatilag a transzkripció alatt végbemegy, addig eukarióta sejtekben az összes rRNS egy molekulaként szintetizálódik, és e különböző átalakulások csak a transzkripció teljes befejeződése után mennek végbe.

rRNS processing mutáns /rne/ sejtekben

Az rRNS processing mechanizmusának tisztázásában nagy szerepe volt olyan törzsek vizsgálatának, amelyek mutánsok voltak a rRNS bioszintézisében. Az ilyen mutáns törzsekben olyan RNS prekursorokat lehet találni, amelyek vad típusú sejtekben soha nem detektálhatók, és amelyek a processingben résztvevő enzimek részletes vizsgálata során szubsztrátként felhasználhatók.

1973-ban két mutáns törzset izoláltak. Az egyik RNáz III aktivitását veszítette el /21/, míg a másik

-rne105?

az RNáz P enzimre nézve tartalmazott mutációt /35/.

1978-ban Apirion és Lassar /7/ RNáz III törzs mutagenézisével egy olyan törzset hozott létre, amely hőmérséklet szenzitív volt, és poliakrilamid gélen vizsgálva a rRNS mintázatát azt találták, hogy a 23S és az 5S rRNS helyett 25S rRNS-t hoz létre.

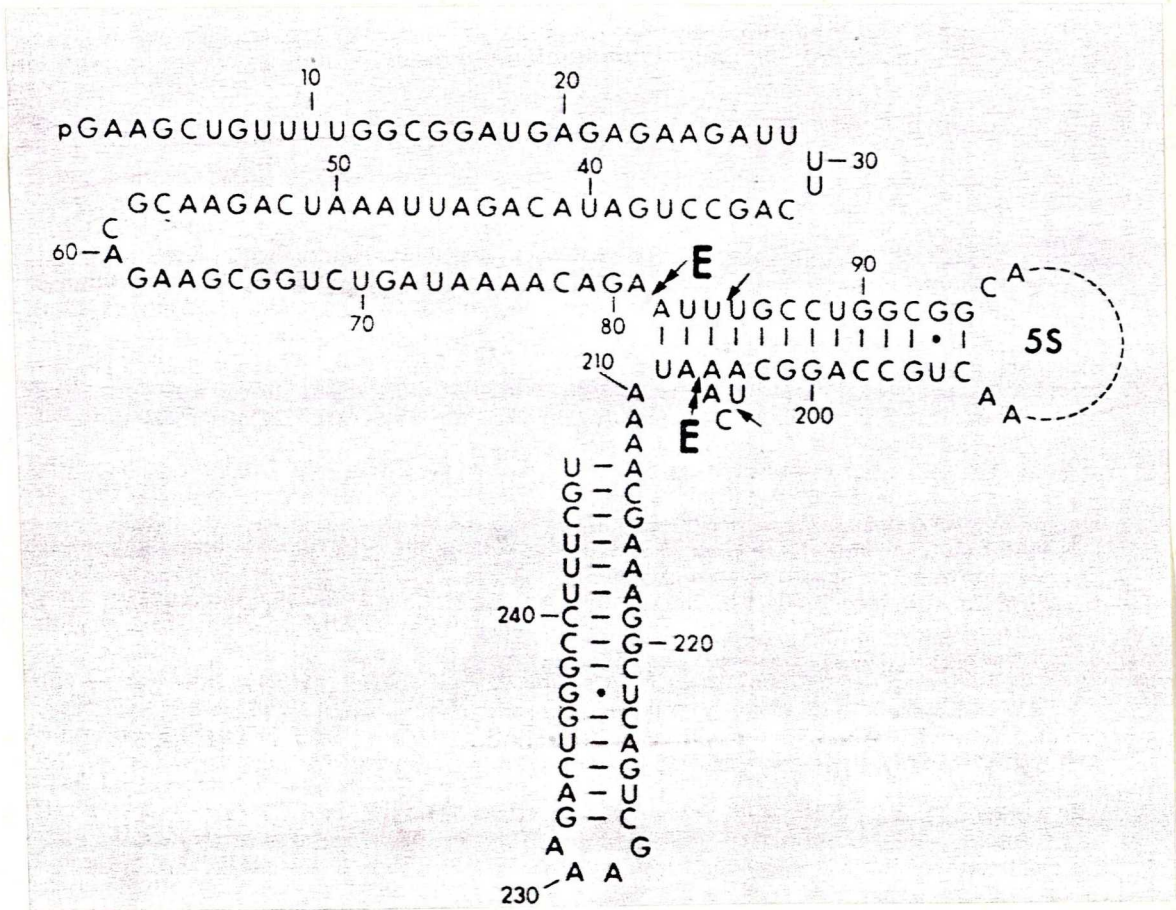
Ha ezt a hőmérséklet-érzékeny mutációt RNáz III⁺ genetikai háttérbe transzdukálták, a kapott törzs 23S képzése normális volt, de az 5S rRNS nem jelent meg 43 °C-on /5, 18/.

Ez a mutáció az rne-3071, egy recesszív ^{point? egy pont} egy pontos ^{mutáció} mutáció, amelyet az E.coli genomban a 24. perhez térképezték.

Ha az ^{2 RNáz III} rnc-105 és az rne-3071 mutációt kombinálták, akkor a Lassar és Apirion által izolálthoz hasonló fenotípusú törzset nyertek.

Az új detektálható RNS az rne törzsben a 9S, amely magában foglalja a p5 rRNS-t és ennek mindkét végén elhelyezkedő extra nukleotidokat.

9S rRNS szekvenciaanalízisét is elvégezték /17/ és e szerint az 5' végtől a p5-ig a 9S 80 bázist tartalmaz, ez megfelel a 4S-nek, a következő p5-nek megfelelő szekvenciák és a 9S 3' végét tartalmazó szekvenciák alkotják a 7S rRNS-t /3. ábra/ /26/.



3. ábra. *Escherichia coli* 9S rRNS szekvenciája és másodlagos szerkezete.

nyíl: 5S rRNS 5' és 3' vége

kettős nyíl: RNáz E hasítási helye

RNáz E enzim jellemzése

Az rne^+ gén által kódolt enzim, az RNáz-E pontos működési mechanizmusát 9S rRNS szubsztrátumon vizsgálták, amely az RNáz-E /rne/ hőmérséklet-szenzitív mutáns törzsekben akkumulálódik.

Az enzimről megállapították, hogy a molekulásúlya ^{dalt} 70.000, alegység szerkezete ismeretlen. Az RNáz-E által katalizált reakció hőmérsékleti optimuma 30°C , pH optimuma 7,6 és 8,0 között van, 0,1-0,2 M monovalens kation $/\text{NH}_4^+, \text{K}^+ \text{ vagy } \text{Na}^+ /$ és 1 mM Mn^{2+} vagy 5 mM Mg^{2+} jelenlétében. Az enzimátikus hasítást nagy tömegben jelenlévő RNS gátolja.

Az enzimátikus reakció elején, vagy nagy koncentrációban jelenlévő élesztő RNS jelenlétében azt tapasztalták, hogy két fő hasítási termék jelenik meg, ez a 4S és a 7S molekula.

Ha a hasítást hagyták teljesen végbemenni, akkor azt találták, hogy a 7 S molekula p5 rRNS-é alakul át.

Az első hasítás a dupla szálú és a szimpla szálú RNS rész ^{katalizál?} között jön létre, a második pedig két nukleotid-^{kecskéspárral?} dal arrébb a helikális struktúrában következik be.

Mindkét hasítást az RNáz-E enzim végzi, mert mindkettő elmarad az rne mutáns törzsben, és ha ilyen törzsek kivonatait használták azt tapasztalták, hogy a hasítások hőmérsékletérzékenyek.



az 1. ábrán
nem egyezik

Későbbi vizsgálatok tisztázták, hogy az RNáz-E olyan nagyobb rRNS transzkriptumokból is kihasítja a p5 rRNS-t, amely a p5-t és vég tRNS szekvenciákat hordoz /33/, illetve amely tartalmazza a p5-t és a 23S rRNS-t /25S rRNS/ /19/.

A N Y A G É S M Ó D S Z E R

Escherichia coli törzsek

mutipus? genotipus?

N 3433	:	rne ⁺ , lac
N 3431	:	rne 3071, lac /20/
N 3438	:	rne 3071, rec A, his, trp, rpsL, lac
N 3439	:	Ts ⁺ rne ⁺ spontán revertáns a N 3438 törzsből
N 5701	:	N 3431 /pRE 101/ /32/
N 5715	:	N 3438 / pRE 101
N 5725	:	N 3438 / pRE 102
N 5729	:	N 3438 / pRE 106
N 5730	:	N 3438 / pRE 107
N 5736	:	N 3438 /pRE 108
N 5732	:	N 3438 / pRE 109
N 5734	:	N 3431 / pRE 111
N 5742	:	N 3438 / pRE 117
N 5713	:	rne rho /p ^J R 3 /37/
N 1411	:	min A1; min B2

Kísérletekben felhasznált plazmidok

pBR 322 /9/

pBR 329 /11/

pGA 46 /4/

pRE 101 /32/

pRE 102, 106, 107, 108, 109, 111, 117 /származtatásuk
és leírásuk az Eredmények részben/



Tápoldatok

YTA tápoldat

5 g NaCl,
10 g Tripton .
1 g élesztőkivonat
desztillált vízzel 1000 ml-re feltöltve
pH 7,2

^{32}P jelölő tápoldat /TBM/

40 mM TRIS
51 mM NaCl
20 mM KCl
21,5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0,6 % pepton
0,2 % glükóz
pH 7,4

Restriktációs enzimek

Pst I, Cla I, Bam HI, Sal I és T4 ligáz /Boehringer Mannheim/

Hind III, EcoR I, Pvu I /New England Biolab./
alkalikus foszfatáz, intestine /Sigma/

DNS preparálás

Minden plazmid DNS preparálást Birnboim és Doly által leírt módszer szerint végeztünk /8/.

Rekombináns plazmidok előállítása

Minden esetben a vektor DNS-t a megfelelő restriktációs enzimmel linearizáltuk és alkalikus foszfatázzal kezeltük.

A ligáláshoz szükséges DNS fragmenteket úgy mértük, hogy a megfelelő restriktációs endonukleázzal hasítottuk a DNS-t, agaróz gélen megfuttattuk, majd az agarózból izoláltuk a DNS-t /38/.

Az agaróz gél elektroforézise Maniatis és mtsi leírása alapján történt /24/.

Escherichia coli sejtek transzformációja

A transzformációt Cohen és mtsi /10/ által leírt technikával végeztük.

A transzformált sejteket a plazmidtól függően 30 µg/ml ampicillint vagy 20 µg/ml tetraciklint, vagy 30 µg/ml kloramfenikolt tartalmazó YTA-agar lemezekon növesztettük 30 °C-on.

SDS poliakrilamid gél elektroforézis

Az elektroforézis során használt futtató gél összetétele a következő volt:

10-12 % Acrylamid /30,8 % törzsoldatból/

0,3 M Tris-HCl pH 8,8

0,2 % SDS

0,1 % Ammóniumperszulfát

30,8 % Acrylamid törzsoldat

30 % Acrylamid

0,8 % Bisacrilamid

A Fedő gél tartalmazott:

5 % Acrylamidot /30,8%törzsoldatból/

0,3 M Tris-HCl-t pH 8,8

0,1 % Ammóniumperszulfátot

A géleket 0,05 M TRIS, 0,3 M glicin, 0,1 % SDS összetételű pufferben futtattuk /23/.

S 30 kivonat készítése

A sejteket YTA tápoldatban növesztettük egy éjszakan át 30 °C-on történő rázatással, majd centrifugálással összegyűjtöttük.

A csapadékot kétszer átmostuk TM2 pufferrel /10 mM TRIS HCl, 10 mM MgAcetát pH 7,5/, majd TM2 pufferben feluszpendáltuk és ultrahanggal feltártuk a sejteket.

A sejtmaradványokat centrifugálással eltávolítottuk /9000 rpm x 20 pec/, majd a felülúszó továbbcentrifugálásával /30 000 g x 80 perc/ nyertük az S30 kivonatot /26/.

Valamennyi műveletet 0 °C-on végeztük.

RNáz E aktivitás kimutatása /in vitro processing/

A reakciót 20 μ l-es térfogatban végeztük, amely 15-15 μ g proteint tartalmazott a különböző törzsekből készített S30 kivonatokból és kb. 2 000 cpm 7S RNS-t szubsztrátként /37/.

Az S30 kivonatokat 10 percig 30 °C-on vagy 43 °C-on előinkubáltuk, majd a 7S RNS hozzáadása után 30 percre 30 °C-on tartottuk a reakcióelegyet.

A reakciót 10 μ l 1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 % szacharóz és 0,1 % brómfenolkék összetételű oldattal állítottuk le, és akrilamid gélen futtattuk a mintákat.

RNS-ek in vivo jelölése és izolálása

A sejteket TBM tápoldatban 30 °C-on rázatva OD₅₆₀ = 0,3-ig növesztettük. Általában 0,1-0,2 ml sejt-szuszpenziót jelöltünk 50 μ Ci ³²P-val. 30 °C-on illetve 44 °C-on 40 percig. A jelölést 1 ml stop oldat /80 % etanol, 1 % dietil pirokarbonát, 0,2 mM aurintrikarboxilsav/ hozzáadásával állítottuk le és 5 percre jégbe állítottuk a reakcióelegyet.

A sejteket SDS-t tartalmazó pufferben feltártuk és 200 000 - 300 000 cpm aktivitást vittünk fel mintánként poliakrilamid gélre.

Az in vitro processingben szubsztrátként használt 7S RNS jelölése hasonló módon történt, de általában 2-3 ml sejtet jelöltünk 2-3 mCi ³²P-val /37/.

A 7S RNS-t akrilamid gélen történő elektroforézis után a gélből izoláltuk.

Minisejt preparálás

A különböző plazmidokat tartalmazó N1411 törzset YTA tápoldatban 37°C -on történő rázatással felszaporítottuk. A 2 liter tápoldatban levő sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és 20 ml pH 7,8 foszfát pufferben felfuszpendáltuk. A szuszpenziót 4 db egyenként 25 ml 10-30 % szaharóz grádienszt tartalmazó centrifugacsőbe vittük, óvatosan a grádiens tetejére rétegezve. A szaharóz grádienszt -70°C -on történő fagyasztással, majd 4°C -on való felengedéssel készítettük. A minisejteket a normál sejtektől a szaharóz grádiensben történő centrifugálással választottuk el /20 perc x 5 000 rpm, 4°C , Sorvall HB+ rotor/ /9/. A megbízhatóan csak minisejteket tartalmazó preparátum nyeréséhez a grádiensben való centrifugálást általában még kétszer megismételtük. Az így kapott sejteket annyi tápoldatban szuszpendáltuk fel, hogy $A_{600} = 0,6$ értéket kapjunk. Ez megfelelt 1×10^{10} minisejt/ml koncentrációnak, A fent említett tápoldat összetétele a következő: $0,03 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$, $0,01 \text{ M NaCl}$, $0,02 \text{ M NH}_4\text{Cl}$, $0,025 \text{ M KH}_2\text{PO}_4$, 2 % glükóz, $0,001 \text{ M MgCl}_2$, $0,5 \text{ } \mu\text{g/ml}$ tiamin, 0,4 % casaminoacid, $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ D-cycloserin, pH 7,5/.

A jelölés előtt $500 \text{ } \mu\text{l}$ minisejt szuszpenziót 40 percig 37°C -on inkubáltunk, majd $20 \text{ } \mu\text{Ci L-}^{35}\text{S}$ -metionint tartalmazó metionin assay medium /DIFCO/ hozzá-

adása után ezt további 40 percig folytattuk. A sejteket mosás után feltártuk. A mintákat 12 % SDS^p-oliakrilamid gélen történt elektroforézis után vizsgáltuk /23/.

✓p

EREDMÉNYEK

A pRE 101 plazmid nem tartalmazza a teljes rne gént

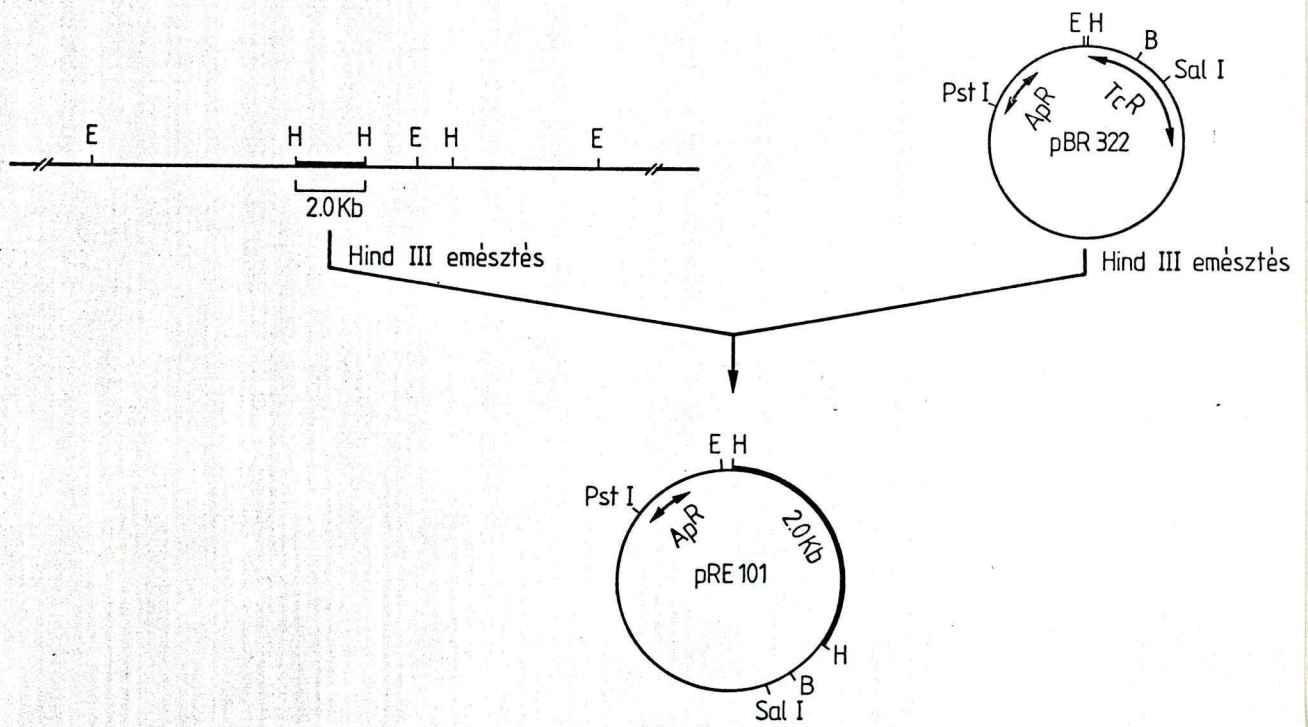
Korábbi közlemények szerint az *Escherichia coli* rne génjét, amely az RNáz E-t kódolja Ray és Apirion előbb fág vektorba majd pBR 322 plazmidba klónozták /31, 32/.

Az így nyert plazmid pRE 101 /4. ábra/ azonban nem komplementálja az rne-3071 mutáns törzset. A szerzők által kapott pozitív eredmény azzal magyarázható, hogy recipiensként a N 3431 *Escherichia coli* törzset használták, amely rne⁻ rec⁺ volt. Ebben az esetben nem kizárt annak a lehetősége, hogy rekombináció játszódjon le a baktérium DNS és a klónozott fragment között.

Ennek bizonyítása többféle képpen történt. A N5701 törzsből amely rec⁺ rne genetikai háttérben tartalmazta a pRE 101 plazmidot, elimináltuk a plazmidot. Ez úgy történt, hogy a N5701 törzset négy cikluson keresztül szaporítottuk ampicillint nem tartalmazó YTA tápoldatban, 37 °C-on történő rázatással.

Az így nyert telepeket ellenőriztük ampicillint tartalmazó lemezekben, és a következő eredményt kaptuk.

A vizsgált 69 telepéből 57 Ap^S volt, tehát nem tartalmazták már a pRE 101 plazmidot. Ha ezeknek a



4. ábra. pRE 101 plazmid konstrukciójának sematikus rajza. /32/

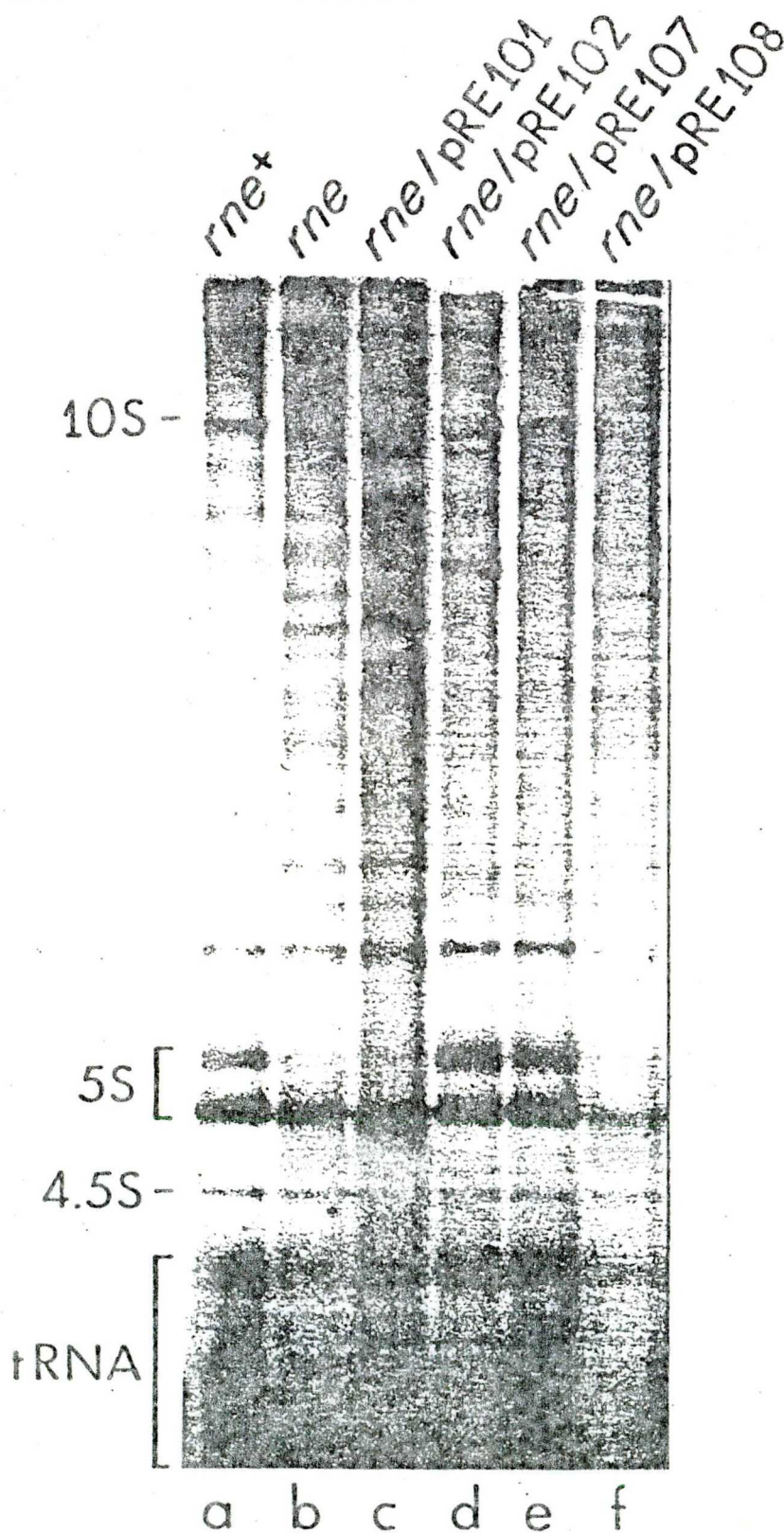
telepeknek 44 °C-on történő növekedését vizsgáltuk, mindegyik Ts⁺-nak bizonyult. Ezek a tények arra utalnak, hogy valóban rekombináció játszódott le a bakteriális DNS és a klónozott fragment között, mivel az eredetileg rne Ts törzs a plazmid elvesztése után rne⁺ Ts⁺ tulajdonságokkal rendelkezett. plazmid
kimutatás?

A rekombinációt bizonyító következő kísérletben a kérdéses pRE 101 plazmidot olyan recipiens sejtbe transzformáltuk, amely rne és rec A tulajdonsággal rendelkezett. A transzformálással kapott telepek továbbra sem nőttek 43 °C-on. A későbbi vizsgálat kimutatta azt is, hogy in vivo jelöléssel a N3438/pRE 101 törzs RNS mintázata /5. ábra/ a plazmid nélküli törzsével egyezik meg /5. ábra b./, tehát az rne gén mutációja miatt nem figyelhető meg az 5S rRNS-nek megfelelő radioaktív RNS képződése.

A teljes rne gént tartalmazó klónok izolálása

Mivel egyértelműen bizonyítást nyert, hogy a pRE 101 plazmid nem tartalmazza a teljes rne gént, feladatunk a továbbiakban a komplett gén izolálása és klónozása volt.

Ehhez a munkához az Escherichia coli DNS-t Eco RI restrikciós enzimmel emésztettük, majd a 10-20 kb-t tartalmazó fragmenteket elektroforézis után kinyertük



5. ábra. Különböző törzsek in vivo jelölése ^{32}P -val plazmid nélkül és *rne* plazmid jelenlétében.



a gélből. Irodalom /32/ szerint ezek a fragmentek tartalmazták az rne gént.

Az izolált fragmenteket a pBR329 plazmid Eco RI helyére ligáltuk, majd a N3438 /rec A, rne-3071/ törzsbe transzformáltuk. A transzformánsok közül azokat izoláltuk, amelyek Ap^R Tc^R Cp^S tulajdonságokkal rendelkeztek.

$G_p = 44 =$
klónozták

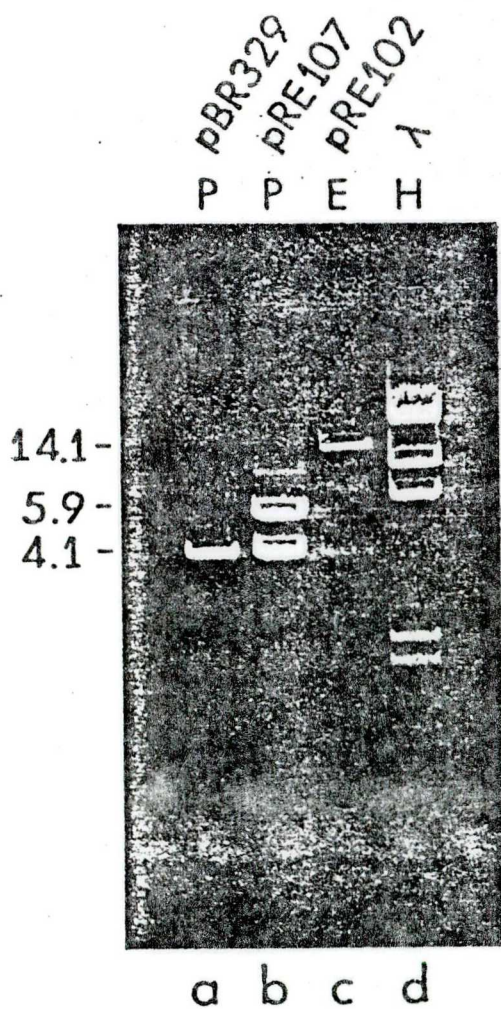
600 ilyen telepet izoláltunk, és ezek hőmérséklet érzékenységét vizsgáltuk tovább. 3 olyan telepet találtunk amely Ts^+ volt, tehát képes volt nőni $44^\circ C$ -on.

Ezekből a telepekből izoláltuk a plazmidot, és agaróz gélelektroforézis után analizáltuk őket. Mindhárom plazmid azonosnak bizonyult. pRE 102-nek jelöltük és 4,1 kb pBR329-ből és 14,1 kb E.coli fragmentből állt /6. ábra, c/. Kontrollként λ Hind III-fragmenteket használtunk. A klónozott fragment tehát tartalmazza az RNáz E génjét, de valószínűleg sokkal nagyobb annál.

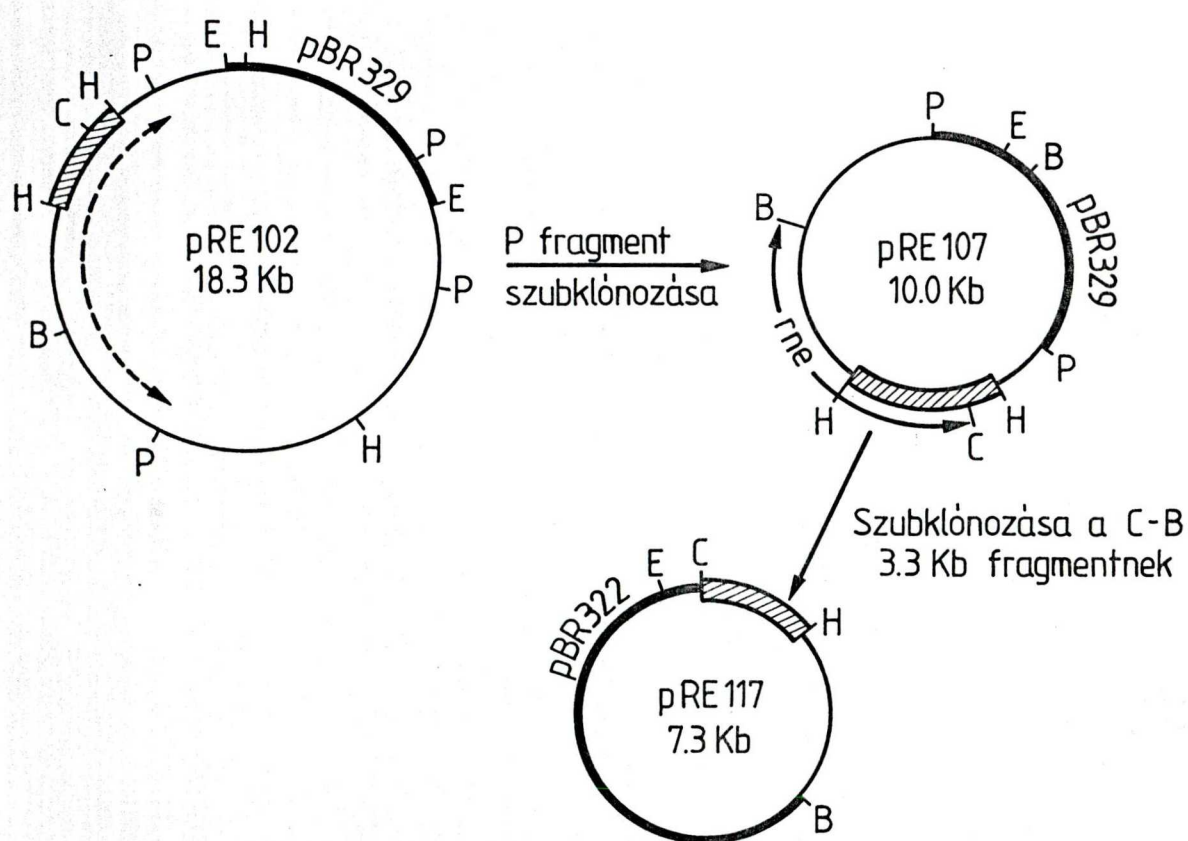
Igy a további kísérletek célja a 14,1 kb-os fragment csökkentése volt.

Ennek érdekében néhány átklónozást kellett végrehajtani.

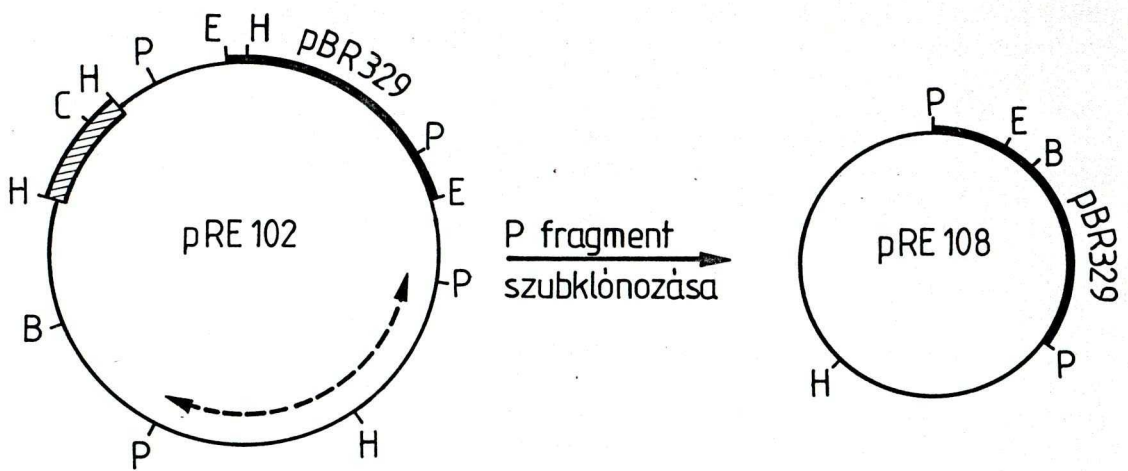
Igy keletkezett a pRE 107 /10 kb/ jelzésű plazmid /7. ábra/, amely a pRE 10-2-ből a szaggatott vonallal jelölt Pst I fragmentet tartalmazza pBR 329-ben és a pRE 108 plazmid amely a pRE 107-ben nem szereplő Pst I fragmentet hordozza szintén pBR 329-ben /8. ábra/. A szelekciót azokra a telepekre, amelyeken a rekombináns



6. ábra. rne gént tartalmazó plazmidok restrikciós endo-nukleázzal történt emésztés után 1 % agaróz gélen.



7. ábra. Különböző plazmidok sematikus rajzai



8. ábra. Különböző plazmidok sematikus rajza i

plazmid komplementálja az rne mutációt, a 44 °C-on történő növekedéssel végeztük. 44 °C-on Ts⁺-nak bizonyult a pRE 107 és TS-nek a pRE 108 a N3438-ban.

Ezt az eredményt tükrözte az in vivo jelölés is 44 °C-on /5. ábra/. RNáz E aktivitás, tehát 5S rRNS képződés a pRE 102 és pRE 107 plazmid esetében megegyezett az rne⁺ törzsével.

A legkisebb fragment, amely még komplementálni tudta az rne mutációt, a 3,3 kb Bam HI-Cla I volt, amelyet a pBR 322 plazmidba juttattunk be. Az így nyert plazmid a pRE 117 /7. ábra/.

A promóter helyének megállapítása

Az első utalások arra, hogy az rne gént promoterrel együtt sikerült izolálni abból erednek, hogy az 5,9 kb Pst I fragment a pBR 329 plazmidban mindkét orientációban komplementálja az rne-3071 mutációt. A transzformálással kapott telepek Ts⁺-ak voltak. Ebből arra lehetett következtetni, hogy a transzkripció egy belső promóterből indulhat ki. A promóter helyének lokalizálására a pGA 46 plazmidot használtuk.

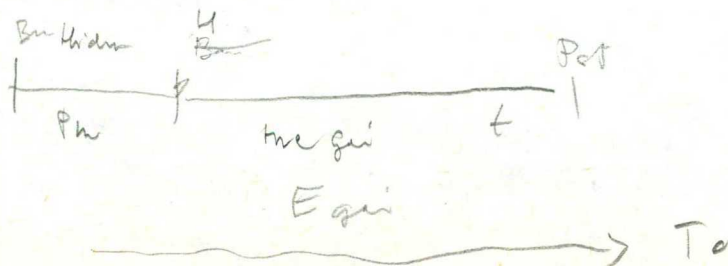
Ha a pRE 107 plazmidból a BAMHI-Pst I fragmentet /4,2 kb/ a pGA 46 plazmid Bgl II-Pst I helyére ligáltuk és az így nyert pRE 109 plazmidot /9. ábra/ a N3438 törzsbe transzformáltuk, komplementációt figyelhettünk

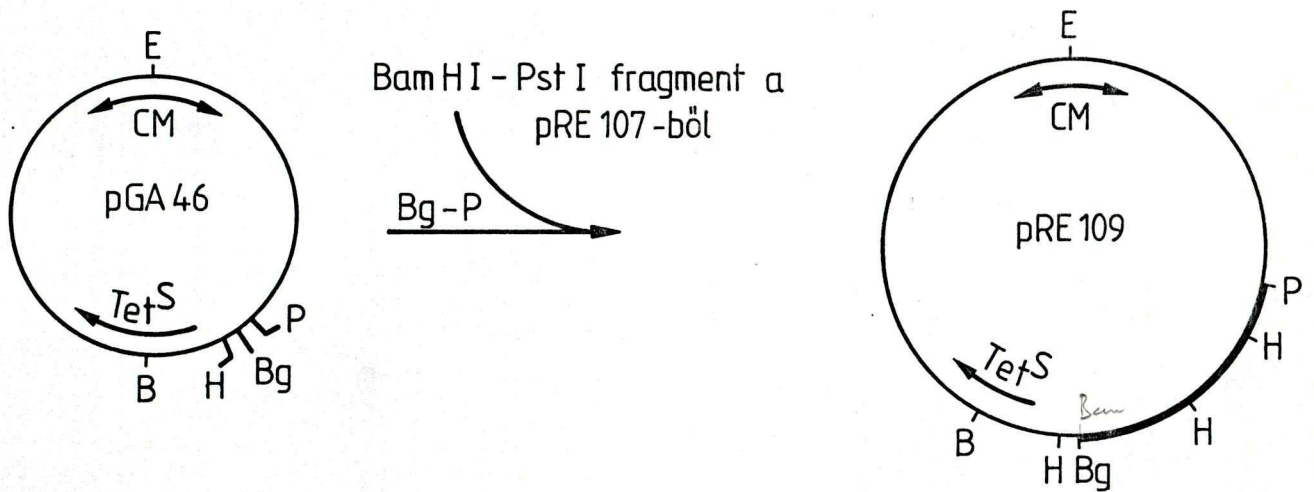


meg: a kapott telepek Ts^+ -ok voltak. ✓ Azonban alacsony /7 $\mu\text{g/ml}$ / tetraciklin koncentráció esetében sem kaptunk Tc^R telepeket. Ezt úgy lehet magyarázni, hogy vagy a fragmentben a promóter nem megfelelő orientációjú a Tc génre nézve, vagy a Bam H-I-Pst I fragment a promóter mellett egy terminátor jelet is tartalmaz. Ez utóbbit erősítette meg az a kísérlet, amelyben az 1,6 kb Hind III fragmentet klónoztuk az expressziós vektorba. Az így kapott pRE 111 /10. ábra/ plazmidot tartalmazó sejtek Tc^R -nek mutatkoztak 20 $\mu\text{g/ml}$ antibiotikumot tartalmazó táptalajon is, de 44 °C-on Ts fenotípust mutattak, tehát a fragment nem tartalmazza a teljes génjét az RNáz E-nek.

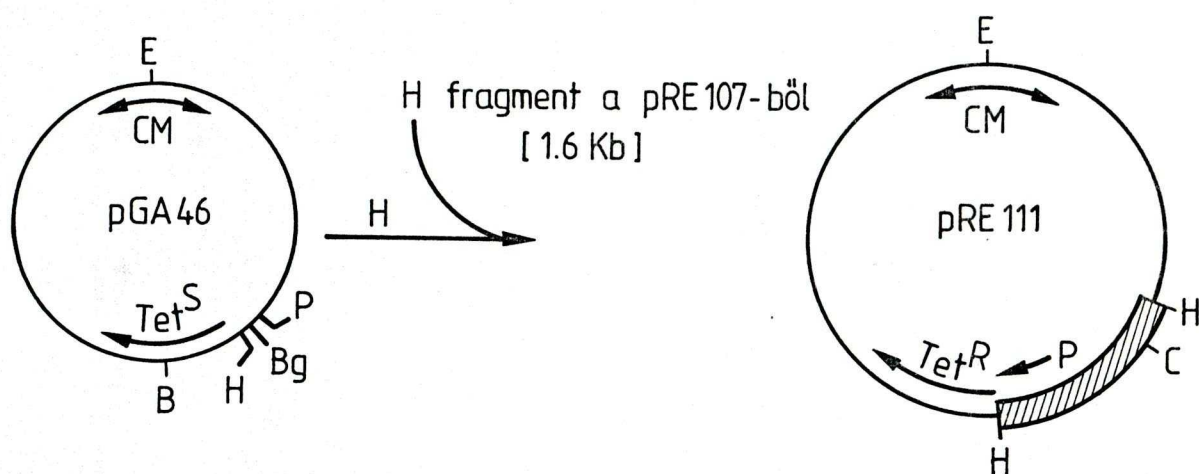
A Hind III fragment orientációja ugyanaz volt a pRE 111-ben, mint a pRE 107-ben.

A kapott kísérleti eredmények azt mutatják, hogy a Bam HI-Pst I fragment /4,2 kb/ tartalmazza a promótert és a terminátort is, mivel az 1,6 kb Hind III fragment a pGA 46 plazmidban tetraciklin rezisztenciát eredményez, biztosan megállapítható, hogy a terminátor ezen a fragmenten kívül található.





9. ábra. Endogén promóter lokalizálásához felhasznált plazmidok.



10. ábra. Endogén promóter lokalizálásához felhasznált plazmidok.

RNáz E túltermelés

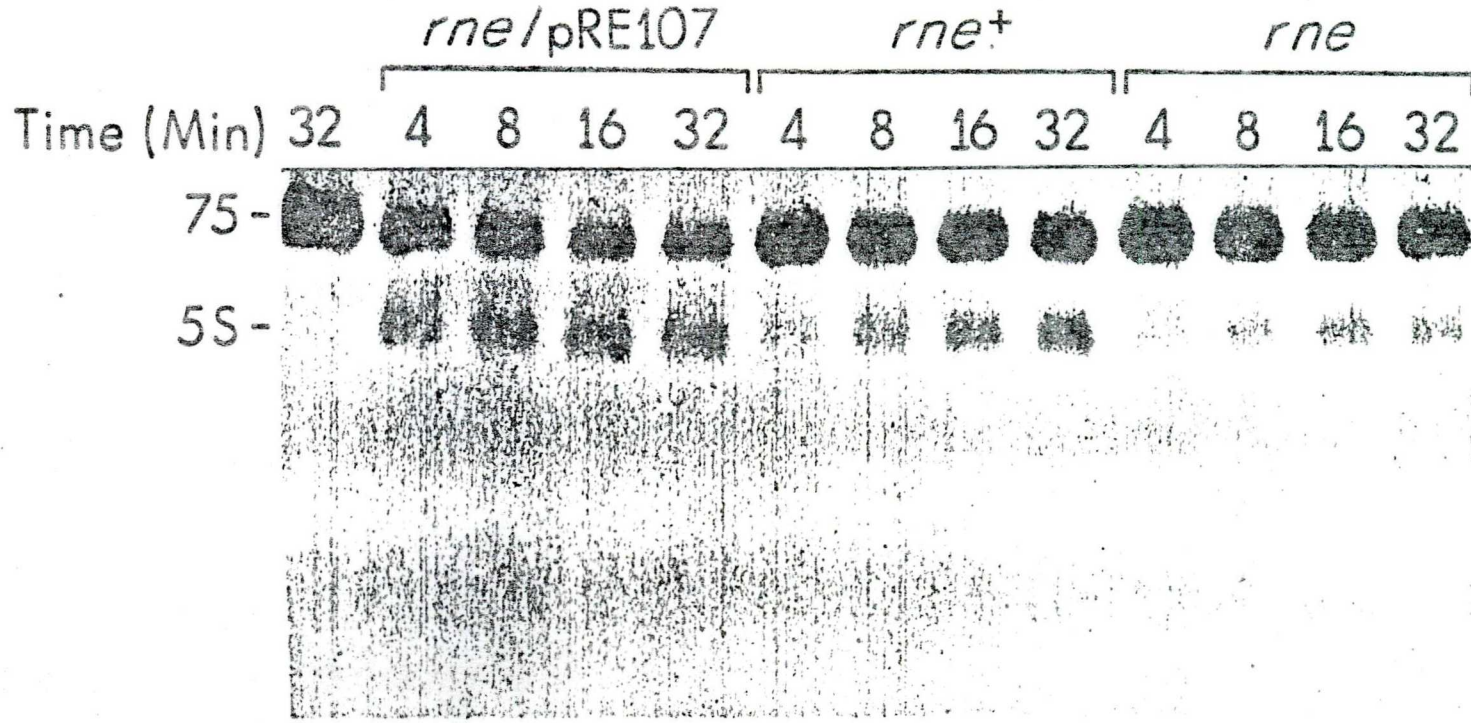
Az RNáz E enzim szintjének a megállapítására az anyag és módszer fejezetben leírtak szerint az in vitro processinget végeztük el különböző törzsekkel.

Amennyiben a N3433, N3439 és N3433/pRE 10⁷ valamint a N3439/pRE 10⁷ törzsek S30 kivonatát használtuk, megállapíthattuk a képződött 5S rRNS radioaktivitása alapján, hogy a kromoszómán és a plazmidon is rne⁺ géneket hordozó törzsekben az RNáz E aktivitás nagyobb, mint a plazmidot nem tartalmazó rne⁺ törzsekben. ✓ ok

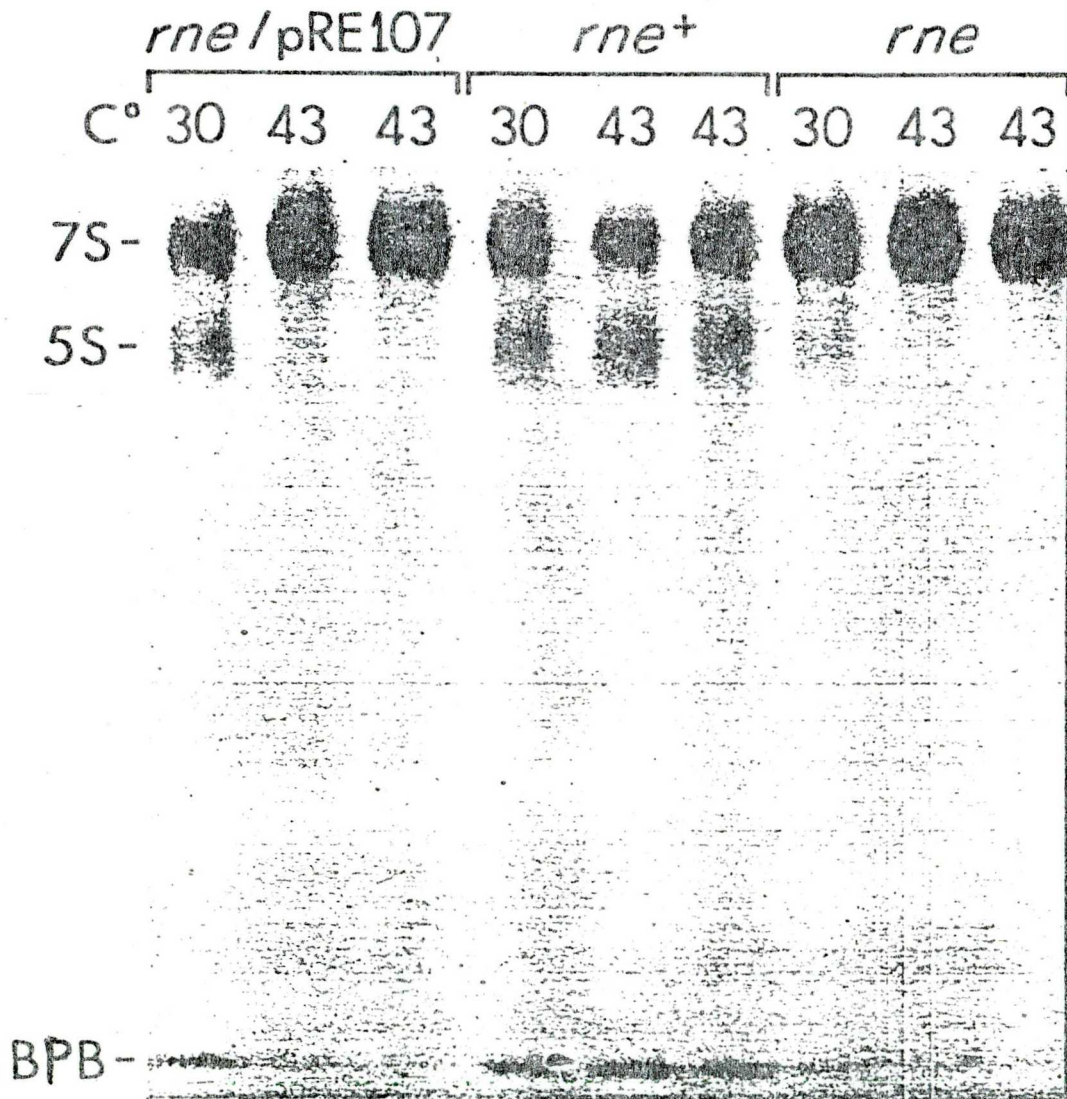
Azokban a kísérletekben amelyekben az rne/pRE 10⁷ törzs RNáz E aktivitását hasonlítottuk össze a szülői és a vad típusú törzsekével hasonló eredményeket kaptunk /11. ábra/. Az 1. táblázat adatai ezt a megfigyelést számszerűleg is alátámasztják.

Az ismertetett adatok azt mutatják, hogy azok a nagy kópiaszámban jelenlévő plazmidok amelyek tartalmazzák az RNáz E génjét felemelik az RNáz E enzim szintjét a sejtekben. Ez az emelkedés két-háromszorosnak bizonyult. *konk*

A fent ismertetett eredményeket akkor kaptuk, amikor a kísérletet 30 °C-on végeztük el. Amennyiben a S30 kivonatot 44 °C-on előinkubáltuk, és ezután végeztük el vele az in vitro processinget 30 °C-on, az RNáz E aktivitása lényegesen megváltozott /12. ábra, 1. táb-



11. ábra. RNáz E aktivitása különböző törzsekben 30 °C-on.



12. ábra. 5S rRNS képződése 7S RNS-ből , mint szubsztrátból 30 °C és 43 °C-on.

	N3433	N3438	N5730
	<u>/rne⁺/</u>	<u>/rne/</u>	<u>/rne/prelo7/</u>
30 °C	128	50	230
43 °C	141	19	21
30 °C ^X	94	75	205

1. táblázat. Az in vitro processing során képződő jelölt 5S rRNS mennyisége CPM-ben kifejezve.
^Xa 11. ábra 16. percéhez tartozó értékek a többi adat a 12. ábrán feltüntetett kísérletből származik.



lázat/. Mint az ábrán látható, ilyen kísérleti körülmények között pRE 107 plazmidot tartalmazó törzs enzimaktivitása megegyezik a N3438 rne törzsével. Ebből feltételezhető, hogy a mutáns gént a kromoszómán és a vad típusú rne gént a plazmidon hordozó törzsekben a termelő RNáz E termotabil. Az enzim valószínű polimer formában létezik, ilyen ezekben: a kromoszómán lévő rne gén és a plazmidban kódolt rne⁺ gén terméke összekeveredik és ez eredményezi azt, hogy gyakorlatilag az RNáz E aktivitása a mutáns gént hordozó törzsével egyezik meg. 067

RNáz E protein azonosítása

Ahhoz, hogy minél pontosabban meghatározhassuk az rne^+ gén termékeit, szükség volt a pRE 107 plazmidban lévő fragment csökkentésére. Ennek érdekében elkészítettük a pRE 107 plazmid deléciós térképét, úgy, hogy különböző restrikciós enzimek felhasználásával különböző fragmenteket távolítottunk el és a visszamaradó részt újra-
ligáltuk. Az így nyert plazmidokat transzformáltuk a N3438 törzsbe, és a kapott telepek növekedését 44°C -on vizsgáltuk. Azok a plazmidokat tartalmazó törzsek amelyek Ts^+ -nak bizonyultak tartalmazták a teljes rne gént /13. ábra/. A deléciós térképezés során csak egyetlen olyan plazmid jött létre /pRE 118/, amelyik rne^+ -nak bizonyult.

A kapott plazmidokat a N 1411 törzsbe transzformáltuk, amely minisejteket hoz létre. Ezeket a sejteket a kromoszómális DNS-t is hordozó sejtekből az anyag és módszer fejezetben ismertetett módon elválasztottuk és ^{35}S metioninnal jelöltük. Poliakrilamid gélen futtatva a jelölt fehérjék mintázatát vizsgáltuk. Ennek során összehasonlítottuk a plazmid által és a különböző *E. coli* fragmenteket tartalmazó plazmidok polipeptidjeit.

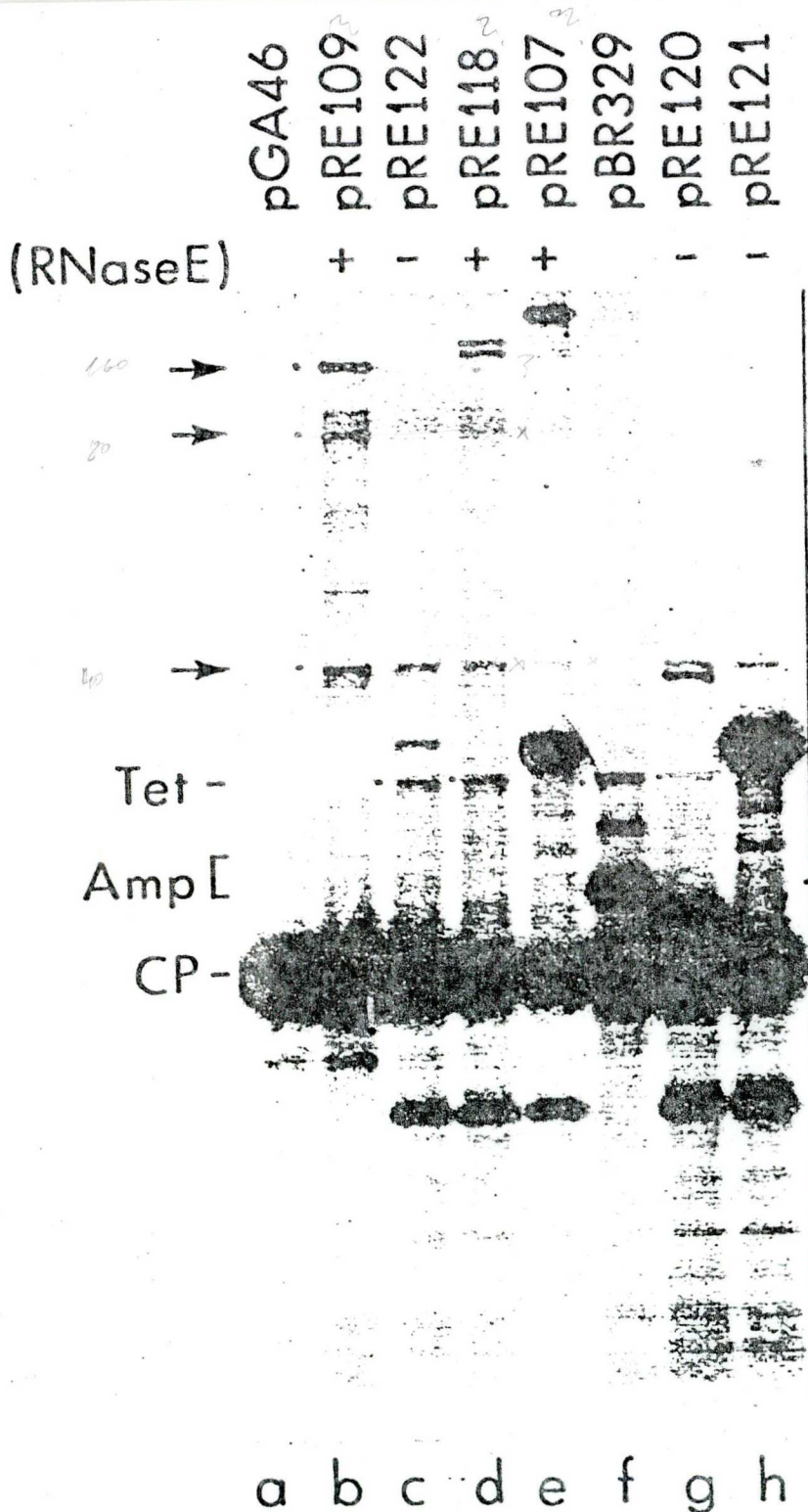
A 14. ábrán nyillal jelöltük azokat a fehérjéket, amelyek az RNáz E enzimként számításba jöhetnek.

A legkisebb fragmentet tartalmazó plazmidban a

pRE 109-ben három fehérjét lehet találni: 40 000, 80 000 és 160 000 dalton molekulásúlyúakat. Ezen fehérjék össz-molekulasúlya 280 000 dalton. Egy ekkora polipeptid kódolásához minimálisan 8,4 kb-nyi DNS szakasz szükséges. Mivel a pRE 109 plazmidban egy 140 000 dalton molekulásúlyú fehérjét kódoló kapacitással rendelkezik, ezért bizonyosra vehető, hogy az RNáz E enzim alegységszerkezetű. Az enzim feltehetően azonos alegységekből áll, és a pRE 109 plazmidban megjelenő polipeptidek a monomer /40 000/, dimer /80 000/ és tetramer /160 000/ formákat jelentik.

OK

pRE 109 max 140 000 d $\rightarrow$ 220 és 160 van lehet RNáz E
valószínűleg 40000 vagy 80000 lehet a
dimer.



14. ábra. Különböző plazmidokat tartalmazó minisejtekben szintetizálódott polipeptidek. A jelölés L- ^{35}S -metioninnal történt.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

- 14,1 kb EcoR I fragmentet az *Escherichia coli* DNS-ből, amely tartalmazta az rne gént, pBR 329 plazmid-dá klónoztunk.
- A rekombináns plazmid megnyilvánult rne⁻ rec A⁻ genetikai háttérben is.
- A legkisebb működőképes fragment 3,3 kb, amely pBR 322-ben található, és endogén promótert tartalmaz.
- Az RNáz E enzim alegységszerkezetű.
- RNáz E enzim szintje szoros kontrol alatt áll. ?
- Mutáns gént a kromoszómán, és vad típusú gént a plazmidban tartalmazó törzsek hőérzékeny RNáz E-t termelnek.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

1. Abelson, J. 1979. RNA processing and the intervening sequence problem. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 1035-1069.
2. Altman, S. 1975. Biosynthesis of transfer RNA in *Escherichia coli*. *Cell* 4: 21-29.
3. Altman, S. 1978. Transfer RNA biosynthesis. *Int. Rev. Biochem.* 17: 19-44.
4. An, G. and Friesen, T.D. 1979. Plasmid vehicles for direct cloning of *Escherichia coli* promoters. *J. Bacteriol.* 140: 400-407.
5. Apirion, D. 1978. Isolation, genetic mapping, and some characterization of a mutation in *Escherichia coli* that affects the processing of ribonucleic acid. *Genetics* 90: 659-671.
6. Apirion, D., Ghora, B.K., Plautz, G., Misra T.K. and Gegenheimer P. 1980. Processing of rRNA and tRNA *Escherichia coli*: cooperation between processing enzymes, p. 139-154. In: D.Söll, J.Abelson and P. Schimmel /ed / *Transfer RNA: biological aspects*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
7. Apirion, D. and Lassar, A.B. 1978. A conditional lethal mutant of *Escherichia coli* which affects the processing of ribosomal RNA. *J. Biol. Chem.*

253: 1738-1742.

8. Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513
9. Bolivar, I., Rodrigues, R.L., Betlack, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Croson, J.H. and Falkov, S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
10. Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by r-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2110-2114.
11. Covarrubias, L. and Bolivar, T. 1982. Construction and characterization of new cloning vehicles. VI Plasmid pBR329, a new derivative of pBR328 lacking the 482 base pair inverted duplication. *Gene* 17: 79-89.
12. Dallmann, G., Quinn, T. and Apirion, D. 1983. A gene affecting Accumulation of the RNA moiety of the processing enzyme RNase P. *J. Bacteriol.* 156: 529-536.
13. Daniel, V. 1981. Biosynthesis of transfer RNA. *Crit. Rev. Biochem.* 9: 253-292.
14. Dougan, A.H. and Glaser, D.A. 1974. Rate of chain elongation of ribosomal RNA molecules in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 87: 775-795.
15. Gegenheimer, P., Watson, N. and Apirion, D. 1977.

16. Gegenheimer, P. and Apirion, D. 1981. Processing of procaryotic ribonucleic acid. *Microbiol. Rev.* 45: 502-541.
17. Ghora, B.K. and Apirion, D. 1978. Structural analysis and in vitro processing to p5 rRNA of a 9S RNA molecule isolated from an rne mutant of *E.coli*. *Cell* 1015: 1055-1066.
18. Ghora, B.K. and Apirion, D. 1979. Identification of a novel RNA molecule in a new RNA processing mutant of *Escherichia coli* which contains 5S rRNA sequences. *J. Biol. Chem.* 254: 1951-1956.
19. Ghora, B.K. and Apirion, D. 1979. 5S ribosomal RNA is contained within a 25S ribosomal RNA that accumulates in mutants of *Escherichia coli* defective in processing of ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 127: 507-513.
20. Goldblum, K. and Apirion, D. 1981. Inactivation of the ribonucleic acid processing enzyme ribonuclease E blocks cell division. *J. Bacteriol.* 146: 128-132.
21. Kindler, P., Keil, T.U. and Hofschneider, P.H. 1973. Isolation and characterization of a ribonuclease III deficient mutant of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 126: 53-69.
22. Kool, A.J., van Zeben, M.S. and Nijkamp, H.T.T. 1974. Identification of messenger ribonucleic acids and proteins synthesized by bacteriocinogenic factor

- Clo DFl3 in purified minicells of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 118: 213-224.
23. Laemli, U.K. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
24. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, T. 1982. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory.
25. Mazzara, G.P., Plunkett, G. and McClain, W.H. 1980. Maturation events leading to transfer RNA and ribosomal RNA. p. 439-545. In: L.Goldstein and D.M. Prescott /eds/, *Cell biology: a comprehensive treatise*, vol. 3. Academic Press, Inc., New York.
26. Misra, T.K. and Apirion, D. 1979. RNase E, an RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254: 11154-11159.
27. Misra, T.K. and Apirion, D. 1980. Isolation, genetic mapping and some characterization of a mutation in *Escherichia coli* that affects the processing of ribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 142: 359-361.
28. Motamedi, H., Lee, K., Nichols, L. and Schmidt, I.J. 1982. An RNA species involved in *E. coli* ribonuclease P activity: gene cloning and affect on transfer RNA synthesis in vivo. *J. Mol. Biol.* 162: 535-550.
29. Pace, N.R. 1973. Structure and synthesis of the ribosomal RNA of prokaryotes. *Bacteriol. Rev.* 37:

562-603.

30. Perry, R.P. 1976. Processing of RNA. Annu. Rev. Biochem. 45: 605-629.
31. Ray, A., and Apirion, D. 1980. Cloning the gene for ribonuclease E, an RNA processing enzyme. Gene 12: 87-94.
32. Ray, A. and Apirion, D. 1982. Characterization of DNA from the rne gene of Escherichia coli: uniqueness of the rne DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107: 1361-1367.
33. Ray, B.K. and Apirion, D. 1980. Identification of RNA molecules which contain 5S ribosomal RNA and transfer RNA in an RNAase E⁻ RNAase P⁻ double mutant strain of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 139: 329-348.
34. Reed, R.E., Baer, M.F., Takada, C.G., Donis-Keller, H. Altman, S. 1982. Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit, M1 RNA, of ribonuclease P from Escherichia coli. Cell 30: 627-636.
35. Schedl, P. and Primakoff, P. 1973. Mutants of Escherichia coli thermosensitive for the synthesis of transfer RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 2091-2095.
36. Smith, J.D. 1976. Transcription and processing of transfer RNA precursors. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 16: 25-73.
37. Szeberenyi, J. and Apirion, D. 1983. 7S RNA: A single site substrate for the RNA processing enzyme ribonuclease

E of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 740: 282-290.

38. Thuring, R.W.J., Sander, F.P.M. and Borst, P. 1975.

A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal. Biochem.* 66: 213-220.

39. Young, R.A. 1979. Transcription termination in the *Escherichia coli* ribosomal RNA operon *rrnC*. *J. Biol. Chem.* 254: 12725-12731.

Ezúttal szeretném kifejezni köszönetemet
David Apirion professzor úrnak a téma felvetéséért,
és a munkához szükséges feltételek biztosításáért.

Köszönettel tartozom Dr. Dallmann Gézának,
akinek szakmai tanácsai segítették a dolgozat
elkészítését.

