B 3091

AZ ESCHERICHIA COLI RIBOSZÓMÁLIS RNS TRANSZKRIPCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA GYAKORLATI ALKALMAZÁSOK

Doktori értekezés

készítette:
Lukácsovich Tamás

tudományos vezető:
Venetianer Pál

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézete

Szeged
1991

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Dr. Boros Imrének, hogy megismertetett az alapvető molekuláris biológiai módszerekkel, és a kísérletek tervezéséhez szükséges gondolkodásmóddal. Ugyancsak hálával tartozom azért a kidolgozott kísérleti rendszerért, amely az addigi munkája eredményeképpen állt elő, és amelyet rendelkezésemre bocsájtott, így kezdetben "kitaposott úton" haladhattam.

Köszönöm Dr. Venetianer Pálnak, hogy számomra a Nukleinsav Csoportban munkalehetőséget biztosított és munkámat irányította. Külön köszönöm azt a messzemenő toleranciát, amellyel önfejűségemet fogadta.

Köszönöm Anton Józsefnénak és Katonáné Lehoczky Klárának a laboratóriumi munkában nyújtott magas színvonalú segítséget.

Hálás vagyok a Nukleinsav Csoport valamennyi munkatársának a sok hasznos tanácsért és segítségért a konkrét problémák megoldásában.

Végezetül nagyon sok hálával tartozom feleségemnek, Fazekas Anikónak, aki mindvégig megértéssel fogadta a munkával töltött estéimet és hétvégéimet és nagymértékben tehermentesített az otthoni feladatok alól.

Tartalomjegyzék

		Oldalszám
1.	Bevezetés	1.
2.	Irodalmi összefoglaló	3.
2.1.	A riboszómális RNS operonok szerkezete	4.
2.2.	Az rRNS szintézis szabályozása a környezeti paraméterek változásaira adott válasz során	6.
2.2.1.	Az aminósav éheztetési (stringens) kontroll	6.
2.2.2.	A szénforrás éheztetésre adott sejtválasz (diauxic lag)	9.
2.2.3.	A szegényebb táptalajról gazdagabb táptalajra helyezés (shift up) hatása az rRNS szintézisre	10.
2.2.4.	A növekedési ráta kontroll és a feed back szabályozás	10.
2.3.	Upstream aktiváció	13.
2.4.	Antitermináció	15.
2.5.	Az E. coli promóterek	17.
2.5.1.	A promóterek felépítése	17.
2.5.2.	A transzkripciós iniciáció	17.
2.5.3.	Promótererősség	18.
2.6.	Expressziós vektorok	19.
2.7.	Plazmidstabilitás	22.
2.7.1.	Kompatibilitás, inkompatibilitás	22.
2.7.2.	A plazmidok stabilizálásának lehetőségei	24.
2.8.	Mutációs gyakoriság a sejtben	25.
2.8.1.	A mutációs frekvencia meghatározása	25.
2.8.2.	A hibára hajlamos javító mechanizmus (error-prone repair)	26.
3.	Célkitűzések	28.

4.	Anyag és módszer	29.
4.1.1.	Vegyszerek	29.
4.1.2.	Táptalajok	30.
4.1.3.	Enzimek	30.
4.2.	Baktériumtörzsek,fágok, plazmidok	30.
4.3.	Módszerek	31.
4.3.1.	Plazmid DNS tisztítása	31.
4.3.2.	M13 replikatív és egyes szálú forma izolálása	32.
4.3.3.	DNS fragmentumok gélelektroforézise	33.
4.3.4.	DNS fragmentumok visszanyerése gélből	33.
4.3.5.	DNS fragmentumok in vitro jelölése	33.
4.3.6.	Transzformáció	34.
4.3.7.	Restrikciós endonukleázok (valamint egyéb "DNS-manipuláló" enzimek használata és a plazmid (illetve fág) konstrukciók térképezése	34.
4.3.8.	Southern transzfer és hibridizálás	35.
4.3.9.	A DNS nukleotidsorrendjének meghatározása	35.
4.3.10.	Oligonukleotiddal irányított mutagenezis	35.
4.3.11.	Fehérjemeghatározás	36.
4.3.12.	Fehérje gélelektroforézis	36.
4.3.13.	In vivo transzkripció	36.
4.3.14.	In vitro transzkripció	37.
4.3.15.	mRNS koncentrációmérés hibridizációval	37.
4.3.16.	In vitro komplementáció (alfa-peptid assay)	37.
4.3.17.	Számítógépes elemzések	37.
5.	Eredmények és megfontolások	38.
5.1.1.	A pER-plazmidok előállítása	38.
5.1.2.	Az alfa-peptid, mint "marker"	39.
5.1.3.	A pER-plazmidok promóterszerkezete	41.
5.1.4.	A pER-plazmidok alfa-peptid aktivitásgörbéi	42.
5.1.5.	Promóterinterferencia	43.
5.1.6.	mRNS koncentráció és féléletidő mérések	44.
5.1.7.	A shift-up reguláció	46.

5.1.8.	A pIl1 plazmid létrehozása	48.
5.1.9.	A pIl1 plazmid in vivo és in vitro promóteraktivitása	49.
5.1.10.	ppGpp szabályozás ?	51.
5.2.1	Promótererősség	53.
5.2.2.	A pKKalfa3 plazmid létrehozása	55.
5.2.3.	A 6/23 illetve tac promóterek aktivitásának összehasonlítása a pER23, illetve pKKalfa3 plazmidokkal transzformált sejtekben	56.
5.2.4.	A 6/23-as promóter konzervatív boxainak "consensussá" alakítása	56.
5.2.5.	További átalakítások	57.
5.3.1.	Expressziós vektorok	59.
5.3.2.	Az expressziós vektorok jellemzői	59.
5.3.3.	Fúziós vektorok	60.
5.3.4.	Direkt klónozó vektorok	61.
5.3.5.	A pER23TA vektorplazmid	63.
5.3.6.	A vektorok felhasználása	64.
5.4.1.	Plazmidstabilitás	65.
5.4.2.	Egy elvi lehetőség a probléma megoldására	66.
5.4.3.	A pER23L1TTCAT plazmid létrehozása	67.
5.4.4.	A rekombinánsok szelektálása	69.
5.4.5.	A rekombinánsok igazolása	69.
5.4.6.	IS10 inszerció	70.
5.4.7.	A pER23LCTI plazmid létrehozása, az "expressziós kazetta" és a "stabilizációs operon" összeépítése	71.
5.4.8.	A plazmidstabilizálás hatása a proinzulin termelése	72.
5.5.1.	A mutációs ráta megnövekedése	73.
5.5.2.	Mutációk a plazmid promóterrégiójában	74.
5.5.3.	Mutációk a plazmid egyéb génjeiben	74.
5.5.4.	Mutációk a kromoszómális génekben	75.
5.5.5.	A részleges anaerobiózis hatása a mutációs gyakoriságra	77.

5.5.6. A recA gén szerepe a mutációs gyakoriság fokozódásában 78.

6. Az eredmények megvitatása (diszkusszió) 79.
6.1. A shift-up reguláció 79.
6.2. Promótererősség 86.
6.3. Expressziós vektorok 91.
6.4. Plazmidstabilitás 94.
6.5. Mutációs ráta fokozódás 101.

7. Összefoglalás 107.

Röviditések jegyzéke

Dolgozatomban a legtöbb helyen ahol röviditéseket, vagy idegen kifejezéseket használok, ezek legelső előfordulási helyén zárójelben megadom a magyarázatukat. Az alábbiakban néhány olyan rövidités következik, amelyek esetében eltértem ettől a gyakorlattól:

bp	bázispár
BSA	bovin-szérum-albumin
c-DNS	RNS templátról reverz transzkripció során keletkező DNS kópia
mRNS	messenger RNS
OD	optikai denzitás
SDS	nátrium-dodecil-szulfát

Az ábráknál használt rövidítések

aa	aminósav
Ap^R,(amp)	ampicillin rezisztencia gén
Tc^R	tetraciklin rezisztencia gén
nt	nukleotid
O,(op)	lac operátor szekvencia
ori,(Ro)	plazmid replikációs origó
P,(pr)	promóter
PAA	poliakrilamid
S.D. (rbs)	Shine-Dalgarno szekvencia (riboszómakötőhely)
T	terminátor

A restrikciós enzimek hasítóhelyeit kezdőbetűikkel jelöltük.

1. Bevezetés

A dolgozatomban ismertetésre kerülő kisérleteket az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetének Nukleinsav Csoportjában végeztem, az 1982-től 1990-ig terjedő időszakban, kezdetben Dr. Boros Imre, majd Dr. Venetianer Pál irányítása mellett. Munkám megkezdésekor már rendelkezésre állt - Boros Imre eredményeinek köszönhetően - egy alkalmas tesztrendszer, amely lehetővé tette az E. coli baktérium egyik riboszómális RNS operonján folyó transzkripció részletes tanulmányozását, vagy általánosabban, a prokarióta transzkripciós reguláció vizsgálatát. Feladataim között szerepelt - az alapkutatás témakörébe tartozó problémák feltárása mellett - eredményeink gyakorlati célú adaptálási lehetőségeinek kidolgozása. Ennek megfelelően dolgozatomban beszámolok - a transzkripciós szabályozásra, a promóteraktivitásra és a mutációs gyakoriságra vonatkozó eredmények ismertetése mellett - egy expressziós vektorrendszer és egy plazmidstabilizációs eljárás kifejlesztéséről is.

A fogalmazás gördülékenysége érdekében több helyen éltem a "labor-zsargont" megközelítő rövidítésekkel (pl. EcoRI helyet említek az EcoRI restrikciós endonukleáz által elhasítható specifikus DNS szekvencia helyett, vagy több esetben plazmidokhoz kapcsolható enzimaktivitásokról beszélek az illető plazmidot hordozó sejtben mérhető enzimaktivitás helyett). Remélem, hogy ezek az egyszerűsitések sehol sem mentek az érthetőség rovására.

Ugyancsak előre kell magyaráznom a "bizonyítványt" a dolgozatomnak egy további jellegzetessége miatt. A megfogalmazást végigkisérő, látszólag teleologikus szemléletet munka-hipotézisként használom. Az igen nagymértékben ökonomikus baktériumsejtben lezajló folyamatokat vizsgálva ugyanis azt tapasztaljuk, hogy a "célszerű" események általában be is

következnek. Más kérdés, hogy az oksági összefüggés (kauzalitás) felismerése az ilyen események hátterében nem mindig egyszerű feladat.

Azon idegennyelvű szavak, vagy szakkifejezések esetében, amelyeknek a magyar megfelelője - véleményem szerint - nem fedi pontosan az eredeti jelentést, mindenhol feltüntettem zárójelben az idegennyelvű változatot is.

2. Irodalmi összefoglaló

A baktériumok -növekedésük során-, egymással folytonos konkurrenciaharcban állnak. Ebből a küzdelemből azok a résztvevők kerülnek ki győztesen, amelyek a legjobban alkalmazkodnak a változó környezeti feltételekhez. A "nyerő" evolúciós stratégia a következő:

Azok a baktériumok amelyek megfelelő tápanyagellátottság esetén gyors növekedésre képesek, ugyanakkor a táplálkozási viszonyok kedvezőtlen alakulása során anyagcseréjüket alacsony szintre csökkentve, a tápanyagokat gazdaságosan hasznositani tudják -vagyis takarékoskodni képesek-, szelekciós előnybe kerülnek társaikhoz képest.

A gyors szaporodás (az élőanyag mennyiségének gyors növekedése), illetve az anyagcsere "takarékra tétele" egyaránt a fehérjeszintézis szabályozásán keresztül valósul meg. Így a fehérjeszintézist végző riboszómák mennyisége, illetve a riboszómákat alkotó riboszomális RNS-ek (rRNS-ek), és riboszómális fehérjék (r-fehérjék) szintézise a sejtben rendkívül sokoldalúan szabályozott.

A szabályozás elsődlegesen az rRNS-ek szintjén valósul meg, a riboszómális fehérjék szintézise az rRNS szint alakulását követi az alábbiak szerint:

Az r-fehérjék génjei operonokba rendeződve találhatók a baktérium kromoszómáján. Minden operonban van egy olyan r-fehérje amely regulátor funkciót is betölt, egyaránt képes valamelyik rRNS-hez, valamint a saját mRNS-éhez kötődni. Az rRNS-hez azonban nagyobb az affinitása, így amíg talál szabad rRNS-t addig csak ahhoz kötődik és azzal együtt egy riboszóma felépítésében vesz részt. Ahogy elfogynak a sejtben a szabad rRNS-ek, a fehérje a saját mRNS-éhez kötődik és ezáltal az egész operon transzlációját gátolja. A gátlás mindaddig érvényesül míg új, szabad rRNS nem

jelenik meg a sejtben.(Fallon és mtsai 1979,Nomura és mtsai 1984,Cole és Nomura 1986).

Az eddig elmondottakból következik, hogy elsősorban a riboszómális RNS szintézis szabályozására kell koncentrálnunk amennyiben meg akarjuk érteni, miként képes alkalmazkodni a baktérium sejt a változó körülményekhez.

2.1. A riboszómális RNS operonok szerkezete

A riboszómális RNS-ek szintézisét biztosító gének a baktérium kromoszómáján transzkripciós egységekbe rendeződve helyezkednek el. Ezeket a transzkripciós egységeket elfogadott, de nem egészen helytálló elnevezéssel operonoknak hivjuk. Az Escherichia coli baktérium kromoszómáján hét rRNS operon van, jelölésük sorra rrn A, B, C, D, E, G és H (Kiss és mtsai 1977). Az operonok többsége a baktérium kromoszómáján a replikációs origóhoz közel helyezkedik el és átírásuk iránya is általában megegyezik a kromoszóma replikációjának irányával (Nomura és mtsai 1977, Ellwood és Nomura 1982).Fizikai térképük (Boros és mtsai 1979), valamint többségük teljes DNS nukleotidsorrendje (Brosius és mtsai 1981) is ismert.

A baktériumok kromoszómáján a legtöbb génnek csak egyetlen kópiája van. Az rRNS operonok redundanciáját az a rendkívüli igény indokolja, amely az rRNS-ek iránt megnyilvánul a sejtnövekedés exponenciális szakaszában. Ugyanez az oka a már említett ténynek is hogy az rRNS operonok rendre a replikációs origóhoz közel helyezkednek el és átírásuk iránya azonos a replikáció irányával. Így ugyanis gyorsan osztódó sejtekben (ahol a kromoszóma részlegesen duplikálódott formában van jelen) a géndózis még tovább növekszik, ugyanakkor az rRNS gének transzkripciója kevéssé interferál a replikációval.

A hét rrn operon felépítése rendkívül hasonló egymáshoz. Régóta ismeretes, hogy a bakteriális riboszómákból három különböző RNS izolálható, ekvimoláris mennyiségben. Ülepedési

(szedimentációs) állandójuk alapján ezeket az RNS-eket 5S, 16S és 23S rRNS-nek jelölték. Az rRNS szintézis kutatásának már a korai szakaszában feltételezték, hogy a strukturgének sorrendje az operonon belül rendre 16S, 23S és 5S rRNS gén, ugyanis rádióaktív pulzusjelölést alkalmazva az rRNS-ek ilyen sorrendben jelölődtek. Hibridizációs kisérletek, majd végül az rrnB operon DNS nukleotid sorrendjének a meghatározása (Brosius és mtsai 1981) igazolta ezt az elképzelést.

Valamennyi operon promóter régiójában két promótert (P1 és P2) találunk melyeket kb. 120 nukleotid választ el egymástól. (A promóterek az RNS-polimeráz kötődésének és az azt követő transzkripciós iniciációnak a helyei.) A promótereket követően helyezkednek el -az említett sorrendben- a strukturgének, majd az operonok végén egy vagy két igen erős, rho-independens transzkripciós terminátor található. Az egyes rrn operonok az rRNS gének közötti un. spacer régióban, valamint az rRNS géneket követően különböző transzfer RNS (tRNS) géneket tartalmaznak. Minthogy a tRNS gének nagyobbik része az rrn operonoktól független transzkripciós egységekben található (Jinks-Robertson és Nomura 1987), igy ennek a kapcsoltságnak a jelentősége nem nyilvánvaló. Mindazonáltal a két RNS fajta szintézisének szabályozása rendkívül hasonló, valamint mindkét RNS típus féléletideje sokkal nagyobb mint a mRNS-eké, ezért gyakran gyüjtőnéven, stabil RNS-ekként (sRNS) hivatkoznak rájuk.

Az rRNS promótereket rendkívüli aktivitásuk már korán az érdeklődés középpontjába állította. A gyorsan szaporodó baktériumsejtben az összes transzkripciós aktivitásnak több mint a fele -a kromoszómának kevesebb mint az 1%-át kitevő- rrn operonokon folyik. Minthogy a transzkripciós elongáció sebessége a sejt egyes génjein csak kismértékben különbözik egymástól és létezik egy túl nem léphető maximális sebesség, az RNS-polimeráz molekulák méretéből és az rRNS operonok hosszából kiszámítható, az operonok "lefedettsége". Az exponenciális növekedési fázisban lévő baktériumsejtekben az rrn operonok 60-70%-ban vannak telítve

RNS-polimeráz molekulákkal, vagyis a 20-25 bázispárt lefedő RNS-polimeráz molekulák 10-12 bázispár távolságban követik egymást. Az emlitett adatokból következik, hogy a transzkripciós iniciáció gyakorisága több mint egy nagyságrenddel nagyobb az rrn operonokon, mint egy teljesen derepresszált, átlagos strukturgén esetében (Pace 1973), vagyis az rrn promóterek a sejt legtöbb promoterénél legalább egy nagyságrenddel erősebbek. (Ide kívánkozik egy érdekes megfigyelés. Az rrn operonok hétszeres redundanciája E. coliban igen stabil, annak ellenére, hogy közülük egy tetszőleges operon látszólag nélkülözhető, kiesése semmilyen észrevehető változást nem okoz a növekedési sebességben (Ellwood és Nomura 1980)).

2.2. Az rRNS szintézis szabályozása a környezeti paraméterek változásaira adott válasz során.

2.2.1. Az aminósav éheztetési (stringens) kontroll.

Egy auxotrof E. coli sejtkultura az esszenciális aminósav megvonására azonnal és rendkívül összetett módon reagál. Az első megfigyelések az RNS, majd a fehérja akkumuláció azonnali leállását állapitották meg. Mig a fehérje szintézis megszünése lehetett a nélkülönözhetetlen aminósav hiányának a direkt következménye is, addig az RNS szintézis vonatkozásában valamilyen szigorú szabályozó mechanizmusnak a létét feltételezték. Már a kezdeti vizsgálatok során kiderült, hogy elsősorban a stabil RNS-ek szintézise blokkolódik, vagyis a stabil és az összes RNS-ek szintézisrátájának hányadósa (Rs/Rt) csökken jelentősen. Ebből következően a baktériumsejt reguláló mechanizmusa képes különbséget tenni az rRNS (helyesebben sRNS) és a mRNS transzkripciója között. Számos kisérlet alátámasztotta, hogy ez a megkülönböztetés a transzkripciós iniciáció szintjén történik.

Mindazoknak a változásoknak az összességét, amelyek a

baktériumsejt kiegyenlített (balanced) növekedésének -az aminósav megvonás során bekövetkező- megzavarásakor egy új egyensúlyi állapot elérése irányába hatnak, stringens kontrollnak nevezik. (Stent és Bremer 1961). Ezen változások első lépése -mint említettem- a stabil RNS szintézis blokkolása. A fehérjeszintézis sebessége az addigi 14-17 aminósav/másodperc értékről 3-5 aminósav/másodperc értékre esik vissza (Dennis és Bremer 1974, Gupta és Singh 1972). A riboszómák mennyisége a sejtben -a szintézis gátlása és a lebomlás fokozódása következtében- mindaddig csökken míg a megmaradó -az eredeti mennyiség kb. 20%-nak megfelelő- riboszómákon a transzlációs elongáció sebessége el nem éri újból a 14-17 aminósav/másodperc értéket.

A jelenség genetikai hátterének vizsgálatakor megállapították, hogy a stringens kontroll a relA gén termékének függvénye. A génben bekövetkező mutáció esetén az említett gyors változások elmaradnak, ezekben a sejtekben aminósav megvonás után is intenzív az rRNS transzkripció, a sejtekben lévő nagyszámú riboszómán a fehérjeszintézis akadozva folyik, a transzláció gyakran megszakad, ezáltal nagyszámú defektív fehérje keletkezik. Így ezekre a baktériumokra az aminósav éhezés megszűnése után hosszú (az éhezés időtartamával arányos) nyugalmi (lag) periódus jellemző, amely addig tart, míg a hibás fehérjék le nem bomlanak. (rel minusz, relaxált mutánsok) (Borek és mtsai 1956, Fiil és Friesen 1968, Lazzarini és Winslow 1970, Pace 1973, Gausing 1977, Nomura és mtsai 1977, Nierlich 1978, Gallant 1979).

A további kutatások kiderítették, hogy a stringens kontrollt mutató sejtekben az aminósav éhezés hatására rendkívül gyorsan guanozin-5'-difoszfát-3'-difoszfát (ppGpp) halmozódik fel. A relA gén terméke a stringens faktor (SF), a riboszómához kötődve egy pppGpp molekulát szintetizál, valahányszor egy töltetlen, kodon specifikus tRNS kapcsolódik a riboszómához, és ezzel egyidejüleg eltávolítja az üres tRNS-t. A stringens faktor által szintetizált pppGpp a gpp gén által kódolt 5'-foszfohidroláz hatására azonnal átalakul ppGpp-vé és a tényleges

szabályozásban ez utóbbi molekula vesz részt.

Jelenleg sem teljesen tiszta a kép, hogy miképpen okozza a ppGpp molekula a stabil RNS promoterek specifikus gátlását. Különösen megoszlanak a vélemények abban a tekintetben, hogy a ppGpp önmagában fejti -e ki a hatását -vagyis tisztított in vitro rendszerben is képes megvalósítani az rRNS transzkripciójának gátlását- vagy egyéb, eddig még nem azonosított faktorok is szerepet játszanak (Nierlich 1978, Gallant 1979). A hatás molekuláris mechanizmusára vonatkozóan a legelfogadottabb elmélet Travers nevéhez fűződik (1980/a, 1980/b és 1984). Travers a DNS felől közelítve meg a kérdést, a stringens kontroll DNS determinánsát a promóterek un. -10-es régiója és a transzkripció startpontja közötti G/C gazdag régióban vélte megtalálni. A régiót diszkriminátor régiónak nevezte el és állítása szerint a specifikus G/C gazdag szekvencia megléte, vagy hiánya dönti el, hogy a promoterre a ppGpp gátló vagy aktiváló hatást gyakorol (Az rrn operonok promóterei közül a P1 promótereket követően megtalálható a diszkriminátor régió, a P2 promóterek azonban nem rendelkeznek vele. Ennek megfelelően a stringens kontrollnak látszólag csak a P1 promóter van alávetve). A ppGpp a szelektív hatását az RNS-polimeráz promoter specifitásának megváltoztatásán keresztül fejtené ki. Az újabb vizsgálatok szerint a diszkriminátor régió megléte szükséges de nem elégséges feltétele annak, hogy egy promóter stringens kontroll alatt álljon (Zacharias és mtsai 1989).

Az elmult 15-20 évben számos összegző munka jelent meg a stringens kontroll témakörében amelyek megkisérelték szintetizálni a nem mindenben ellentmondásmentes eredményeket (Cashel és Gallant 1969, Cashel 1975, Kari és mtsai 1977, Nierlich 1978, Gallant 1979, Cashel és Rudd 1987).

2.2.2. A szénforrás éheztetésre adott sejtválasz (diauxic lag).

Ha a baktérium szénforrásra éhezik, -illetve, ha a sejteket nagyobb tápértékű szénforrásról alacsonyabb tápértékűre helyezzük- a sejtekben az aminósav éheztetés következményeihez rendkívül hasonló változások mennek végbe. Szénforrás éhezés során a ppGpp szintézis sebessége látszólag nem változik, azonban degradációja rendkívül lelassul, így a két folyamat eredőjeként a ppGpp koncentráció ugyanúgy megnő és szabályozó hatását is a fentiekhez hasonlóan fejti ki. Tekintve, hogy ebben az esetben a ppGpp lebomlási sebességének a változtatásán keresztül valósul meg a szabályozás, az érdeklődés középpontjába a lebontásért felelős enzim -a spoT gén terméke- került. A szabályozás megértéséhez vezető másik információ az a meglepő megfigyelés volt, hogy a szénforrásra éhező baktériumokban a működőképes relA gén hiányában is megemelkedik a ppGpp koncentrációja, valamint, hogy a ppGpp -növekedési sebességtől függő- alapszintje is csak kevéssé függ a relA allél minőségétől. Ez utóbbi tény arra utalt, hogy a baktériumok egy másik -a relA géntől független- ppGpp szintetizáló enzimmel is rendelkeznek. (Lazzarini és mtsai 1971, Winslow 1971, Metzger és mtsai 1989/b). Ennek a második enzimnek a mibenlétére akkor derült fény, mikor sikeresen klónozták a relA és spoT géneket és meghatározták az aminósavsorrendjüket. (Metzger és mtsai 1989/a). A két gén -és a két fehérje- részleges homológiát mutatott. A homológia fehérjeszinten 31%-os, illetve, ha az un. konzervatív helyettesítéseket is elfogadjuk (vagyis a hasonló sztérikus és kémiai tulajdonságú aminósavakat azonosnak vesszük), akkor 75%-os volt. Ennek az adatnak az ismeretében már nem meglepepő az a feltételezés, hogy a két fehérje funkcionálisan is homológ, vagyis a keresett ppGpp szintetáz II nem más mint a spoT gén terméke. Az elképzelés szerint az enzim -a körülményektől függően- szintetikus és lebontó funkciókat egyaránt ellát. A feltevés bizonyítására Xiao és mtsai (1991, közlés alatt) -kromoszómális deléciókat képezve- egy relA$^-$

,spoT⁻ kettős mutáns E. coli törzset készítettek, amely a várakozásnak megfelelően valóban nem tartalmazott kimutatható mennyiségű (p)ppGpp-t.

2.2.3. A szegényebb táptalajról gazdagabb táptalajra helyezés (shift up) hatása az rRNS szintézisre.

Az eddig tárgyaltakkal ellentétes irányú változás játszódik le mikor a "sanyarú" körülmények között növekvő sejtek kedvezőbb táplálkozási feltételek közé -gazdagabb táptalajra- kerülnek. (Bremer és mtsai 1973, Nomura és mtsai 1984). Ekkor a sejtek anyagcseréje -és ennek legelső jeleként a riboszómális RNS-ek szintézise- rendkívüli mértékben felgyorsul. Az rRNS szintézis ráta maximumot ér el, majd gyorsan (kb. fél óra elteltével) az új növekedési sebességnek megfelelő értékre (a növekedési ráta és az rRNS szintézis ráta összefüggését a következő pontban tárgyalom) esik vissza. (Pato és Meyenburg 1970). A jelenség magyarázata abban rejlik, hogy nagyobb de novo rRNS szintézis szükséges a nagyobb növekedési sebességnek megfelelő riboszóma készlet előállításához, mint a továbbiakban annak fenttartásához. Mint dolgozatomból a későbbiek során kiderül, ennek a szabályozásnak a DNS determinánsát véljük megtalálni az rrnB operon promotereit közvetlenül követő (downstream) DNS szakaszokban. (Lukácsovich és mtsai 1987).

2.2.4. A növekedési ráta kontrol és a feed back szabályozás.

Mint már az eddigiekből is nyilvánvaló, a baktériumkultúrák növekedési sebessége a külső körülmények -többek között a tápanyagellátottság- függvényében széles tartományban változik. Egy adott növekedési sebesség mellett -a kiegyensúlyozott (balanced) növekedés állapotában-, a makromolekulák bioszintézise koordináltan, állandó sebességgel folyik. A különböző molekulafajták szintézis rátájának hányadósa

állandó, és az adott növekedési sebességre jellemző érték. A növekedési sebesség változásával ezek az arányok megváltoznak. A növekedési rátával az mRNS szintézis sebessége lineáris, az rRNS szintézis sebessége azonban négyzetes összefüggés szerint változik. A jelenség magyarázata ott keresendő, hogy -lévén a sejt fehérjetartalma a különböző növekedési sebességeknél lényegileg azonos- igy kétszer olyan gyors növekedés (feleakkora osztódási idő) mellett ugyanannyi fehérjenek feleannyi idő alatt kell szintetizálódnia. Ezt kétszeres mennyiségű riboszóma tudja megvalósítani (mint tudjuk, az egyes riboszómákon a fehérjeszintézis sebessége nagyjából állandó), ugyanakkor a kétszeres mennyiségű riboszóma elkészültéhez is csak feleannyi idő áll rendelkezésre, így az rRNS szintézis sebességének négyszeresére kell növekednie. Ez a szabályozási jelenség a növekedési sebesség függő kontroll (growth rate control) (Nierlich 1978, Bremer és Dennis 1987).

A növekedési ráta függő kontroll elsősorban az rRNS transzkripció iniciációjának szintjén -az rrn P1 promoterek aktivitását befolyásolva- szabályozza a riboszómák mennyiségét a sejtben. A szabályozás mechanizmusának megismerését célzó kutatások során Nomura és mtsai megállapították, hogy a szabályozást maguk a szabad -fehérjeszintézist nem végző, "fölöslegben" lévő- riboszómák (vagy valamilyen olyan közvetítő molekula amelynek a koncentrációja a szabad riboszómák koncentrációjával arányos) valósítják meg, feed back gátlás formájában (Jinks-Robertson és mtsai 1983, Gourse és Nomura 1984, Gourse és mtsai 1985). Később -állításukat tovább pontosítva- a transzlációra képes szabad riboszómákat tették felelőssé a feed back szabályozás -és ezen keresztül a növekedési ráta kontroll- megvalósításáért. (Az a felismerésük, hogy a feed back reguláció és a növekedési ráta kontroll egyazon jelenség két különböző megnyilvánulási formája, számottevően megkönnyítette a jelenség kisérletes tanulmányozását, ugyanis egy -reporter génhez kötött- meghatározott rrn "teszt promóter" aktivitása, a sejtbe -

nagykópiaszámú plazmidon- bejuttatott "létszámfeletti" rrn operon kópiák jelenlétében, egyszerüen vizsgálható.

Hosszú ideig tartotta magát az az elgondolás, hogy a növekedési ráta kontroll megvalósításában -a stringens kontrollhoz hasonlóan- a ppGpp fontos szerepet játszik, vagyis ez lenne a közvetítő molekula a szabad riboszómák és az rrn operonok transzkripciója között. Ezt az elképzelést látszott alátámasztani az a tény is, hogy a stabil RNS-ek szintézis rátája, elosztva a sejtben folyó össz-RNS szintézis sebességével, olyan értéket ad amely a legkülönbözőbb növekedési körülmények mellett szigorúan fordított arányban változik a sejten belüli ppGpp koncentrációval (Ryals és mtsai 1982). A már említett relA$^-$,spoT$^-$ E. coli törzzsel végzett kisérletek azonban bebizonyították, hogy a ppGpp nem esszenciális a növekedési ráta kontroll megvalósításához (Gaál és Gourse 1990). Hasonlóképpen gyanuba keveredtek korábban az EFtu, EFts transzlációs elongációs faktor fehérjék is. Travers elképzelése szerint az említett fehérjék specifikus szigma faktorként az RNS-polimeráz enzim promóterspecifitását változtatnák meg olyan irányba, hogy az enzim preferenciálisan a stabil RNS promóterekhez kötődjön (Travers és mtsai 1970, Travers 1973, 1976, Biebricher és Druminski 1980). Ebben az esetben a -transzlációra képes- szabad riboszómák a riboszómákhoz nem kötődött elongációs faktorok szintjének meghatározásán (csökkentésén) keresztül fejtenék ki a hatásukat. A későbbi kutatások azonban ezt a feltételezést sem igazolták. A legvalószinübb, hogy a kép sokkal összetettebb, lehetséges, hogy az eddig feltételezett mechanizmusok egyéb, még ismeretlen faktorokkal kooperációban valósítják meg a szabályozást.

A növekedési ráta kontrollért felelős DNS régió egy 50 bp-nál rövidebb, a P1 promótert magában foglaló DNS szakaszra lokalizálható (rrnB P1 -50.bp-tól -4.bp-ig) (Gourse és mtsai 1986, Gaal és mtsai 1989, Dickson és mtsai 1989). A munkacsoport megállapításai szerint a szabályozás független a P1 promóter működését ugyancsak befolyásoló upstream aktiváció (1.3.

fejezet), és antitermináció (1.4. fejezet) jelenségétől. A legújabb kutatások szerint a szabályozás target szekvenciája ennél sokkal pontosabban nem határozható meg (Zacharias és mtsai 1990), a promótert valószínűleg topológiai szerkezete teszi alkalmassá arra, hogy a növekedési ráta kontroll alanyává váljon.

2.3. Upstream aktiváció

Az E. coli promóterek szerkezetének és nűködésének összefüggéseit az irodalmi összefoglaló 2.5. pontja alatt tárgyalom részletesebben. Itt annyit szükséges röviden megemlíteni, hogy a promóterek egy szűkebb értelemben vett un. core promóterből és az azt közrefogó -nehezebben definiálható- szabályozó szekvenciákból állnak. Az utóbbiak közé tartoznak a promótert megelőzően (upstream) elhelyezkedő un. Upstream Aktivátor Szekvenciák (UAS), melyek létezését számos coli promóter esetében leírták (Lamond és Travers 1983, Bossi és Smith 1984, Mizuno és Mizushima 1986, Gourse és mtsai 1986, Plaskon és Wartell 1987, Bauer és mtsai 1988). Ezek a DNS szakaszok több mint egy nagyságrenddel képesek a core promóter aktivitását fokozni. Az rrn operonok promóterei közül a P1 és P2 promóterek egyaránt rendelkeznek UAS-val.
Jóval több információ áll rendelkezésünkre a P1 UAS-t illetően. Ez mintegy 100 bp. hosszúságú -a transzkripciós iniciációs ponttól számított -50. és -150. bp. között elhelyezkedő- A/T gazdag DNS szakasz, amely erősen görbült struktúrával rendelkezik (bent DNS). (A görbület az UAS-t tartalmazó DNS fragment elektroforézisekor futási anomáliát okoz.) A görbületet valószínüleg a periódikusan ismétlődő (a DNS kettős spirál azonos oldalán elhelyezkedő) AAA(A) szakaszok okozzák. (Marini és mtsai 1982, Wu és Crothers 1984, Koo és mtsai 1986.) Rövid -néhány nukleotid hosszúságú- DNS darab beépítése a core promóter és az UAS közé, teljesen megszüntette az UAS hatását, azonban ha az inszert 11 bp-ból állt, a promóter aktivitása nem változott

számottevően (J. T. Newland személyes közlés). Ebben az esetben ugyanis -egy teljes "körbefordulás" után- az UAS megfelelő részei a core promóterhez képest ugyanolyan pozícióba kerülnek. Az UAS eltávolítása mintegy 20-szoros aktivitáscsökkenést eredményez (Gourse és mtsai 1986).

Az upstream aktiváció tanulmányozása során a kutatók arra a következtetésre jutottak, hogy az UAS faktor függő (dependens) és faktor független (independens) módon egyaránt kifejti a hatását. Az utóbbi mechanizmus létét az a tény bizonyította, hogy az UAS jelenléte, vagy hiánya tisztított RNS-polimeráz enzimmel végzett in vitro transzkripció során is hatással volt a promoter aktivitására (Pethő és mtsai 1986). Ugyancsak a faktor-independens aktiváció tényét látszik valószinüsíteni az a tény, hogy az rrnA operon P1 promóterének UAS-ját egy teljesen eltérő nukleotid sorrendű (mitokondriális kinetoplaszt eredetű), de hasonlóan görbült szerkezetű DNS darabra kicserélve sikerült a promóter aktivitását majdnem teljesen helyreállítani (Nachiel és mtsai 1989). A kép azonban valószínűleg jóval összetettebb. Régóta feltételezik, hogy -az eukarióta enhancerekhez hasonlóan- az UAS-ákhoz is kötődnek transzkripciós aktivációs faktorok. Egy ilyen -közelebbről nem azonosított- fehérje faktort írtak le Nachiel és mtsai (1989), amely a sejtben a riboszómákhoz asszociáltan található. Az első, azonosított upstream aktivátor faktor egy DNS-kötő E. coli fehérje, a FIS protein (Nilsson és mtsai 1990, Ross és mtsai 1990), amely meghatározott felismerő helyekhez (un. consensus szekvenciákhoz) kötődik az UAS-án, és ezeken keresztül aktiválja a promótert. Az rrnB P1 promóter UAS-ja 3 egymást követő FIS consensus szekvenciát tartalmaz.
Az rrnB P2 promoter UAS-ájának létét kutatócsoportunkban bizonyítottuk (Lukácsovich és mtsai 1989). Az ezzel kapcsolatos eredményeket dolgozatom későbbi részében tárgyalom.

2.4. Antitermináció

Az antitermináció egyes operonok génexpressziójának szabályozására szolgáló mechanizmus, amely a transzkripciós terminátorok működésének felfüggesztésén keresztül hat, és így lehetővé teszi a terminátorokat követően (downstream) elhelyezkedő gének átírását. Az rrn operonok esetében az antitermináció a terminátorszerű szekvenciák hatásának gátlásában, a normális transzkripció biztosításában nyilvánul meg. A részleteiben leginkább ismert antiterminációs mechanizmus a lambda fág kései génjeinek átírását szabályozza. A működés egy lehetséges elméleti modellje szerint a Nus A protein az RNS-polimerázhoz kötődve, képessé teszi az enzimet specifikus DNS szekvenciák felismerésére (nut helyek). Mialatt az enzim a nut helynél megállva szünetelteti a transzkripciót, a folyamatba egyéb nus faktorok lépnek be és a transzkripciós komplexet antiterminációs hatásúvá változtatják, vagyis képessé teszik különböző terminátor szekvenciák átírására. (Morgan 1986). Több különböző nut szekvencia összehasonlításával megállapítható volt a nut consensus szekvencia is amely 3 különálló "boxot" tartalmaz (Box A, B és C).

Az rrn operonok antiterminációs mechanizmusára a "konvencionális" operonok poláris hatást kiváltó "nonsense" mutációinak tanulmányozása irányította a figyelmet. Ezek a mutációk egy transzlációs stop kodont generálnak az operon valamelyik génjében. A mutáció következtében a transzláció megszünte, majd a riboszómák leválása után a transzkripció is rövidesen terminálódik és az operon disztális génjei már nem kerülnek átírásra. Ugyanakkor az rrn operonok -mintegy 6000 bp-nyi hosszúságukkal- egyetlen transzkriptum formájában íródnak át, látszólag akadálytalanul, annak ellenére, hogy a hosszú transzkriptumon óhatatlanul jelen kell, hogy legyenek terminátorszerű képződmények. Ennek megfelelően a P2 promótertől

néhány bp-nyira downstream valóban megtalálhatók a nut consensus szekvencia boxai, bár a sorrendjük más, mint a lambda fágon (Box B, A és C). Az rrn operonok transzkripciójának feltételezett antiterminációs mechanizmusát számos laboratóriumban igazolták (Aksoy és mtsai 1984, Li és mtsai 1984, Holben és Morgan 1984, Holben és mtsai 1985, Gourse és mtsai 1986).

2.5. Az E. coli promoterek.

2.5.1 A promoterek felépítése.

Összehasonlító statisztikai vizsgálatokat végezve a száznál jóval több -ismert nukleotid sorrendű- E. coli promoterrel, meghatározható volt az un. "consensus" promóter szekvencia, amely az eltérő promóterszekvenciák statisztikai átlagolásából adódott (Hawley és McClure 1983, Harley és Reynolds 1987). A szűkebb értelemben vett promóter -melyhez a transzkripció során az RNS-polimeráz molekula kötődik- kb. 40 bp.-nyi DNS szakaszt foglal magába. Ezen belül kétszer 6 bp. erősen konzervált:
a transzkripciós iniciációs ponttól számítva, átlagosan 35 nukleotidnyi távolságra, upstream található az un. -35-ös régió, melynek consensus szekvenciája TTGACA. Ezt egy 16-18 bp. hosszúságú un. spacer régió követi, majd a -10-es régiót (vagy Pribnow boxot) találjuk, melynek nukleotidsorrendje leggyakrabban TATAAT. A Pribnow boxot követő 5.-8. nukleotidtól indul a transzkripció (transzkripciós startpont).

Az újabb kutatások fényében egyre nyilvánvalóbb, hogy az említett kb. 40 bp.-nyi core promóter szekvenciához további -az egyes promóterek esetében eltérő hosszúságú- upstream és downstream szekvencia elemek kapcsolódnak, melyek szintén felelősek a promóter erősségének és specifitásának (vagyis egyedi szabályozhatóságának) a meghatározásáért (Deuschle és mtsai 1986, Kammerer és mtsai 1986, Brunner és Bujard 1987).

2.5.2. A transzkripciós iniciáció

A transzkripciós iniciáció során az RNS-polimeráz először felismeri a promóter DNS szakaszt és szorosan kötődve hozzá, un. zárt komplexet képez. (A komplexképzés a K_B egyensúlyi állandóval jellemezhető.) Ezt követően a kettős szálú DNS-en a

transzkripciós iniciációs pont közvetlen környezetében egy "buborék" keletkezik, a DNS egyes szálúvá válik és nyitott komplexet képez az RNS-polimerázzal (izomerizáció). A transzkripciós iniciáció harmadik -legkevésbé jellemzett- lépése során az enzim elhagyja a promótert -szabaddá téve azt a következő polimeráz molekula kötődése számára- és megkezdi a transzkripció elongációját (promóter clearance). (Erősen valószínűsíthető, hogy ez utóbbi lépés valójában több elkülöníthető szakaszra osztható, melyek azonban részleteikben még nem ismertek.)

A baktériumokban -az eukarióta sejtekkel ellentétben- egyetlen fajta RNS-polimeráz enzim végzi valamennyi gén átírását. Ennek ellenére az E. coli sejtek képesek különböző "típusú" promóterekre specifikus RNS-polimeráz molekulákat előállítani. Az RNS-polimeráz promóter szelektivitását a különböző szigma faktorok valósítják meg, melyek reverzibilisen képesek asszociálódni az un. holoenzimmel. A szigma faktorok közül csak néhányról rendelkezünk elegendő ismerettel, ezen a téren a kutatásoktól további eredmények várhatók.

2.5.3. A promótererősség

A promóter erősségét -a transzkripciós iniciáció gyakoriságát- az iniciáció fentebb említett három lépésének - valamint az egyes lépések ellenkező irányú reakcióinak- az eredője szabja meg. A promóter mutációk, valamint az aktiváló és gátló faktorok a három lépés valamelyikét befolyásolva képesek megváltoztatni a promóter aktivitását (McClure és mtsai 1983, McClure 1985).

A multban általánosan elfogadott feltételezés volt, hogy a promóterek erőssége korrelál a consensus szekvenciához való hasonlóságuk mértékével (Mulligan és mtsai 1984, Szoke és mtsai 1987). Az upstream és downstream szabályozó szekvenciák felfedezése (az rrn promóterek upstream aktivátor szekvenciáit

(UAS) az 2.3. fejezetben érintettem) árnyaltabbá tette a képet. Ma már senki sem vitatja, hogy az in vivo promótererősséget jóval összetettebb szempontok határozzák meg. Az in vivo promótererősség és a promóterszerkezet összefüggéseit érintő saját kisérleteinket az 5.2. fejezetben tárgyalom.

Nem véletlen, hogy az rrn operonok promóterei a legerősebb in vivo promóterek közé tartoznak, hiszen csak így tudják ellátni feladatukat. Ennek megfelelően a P1 és P2 promóterek nukleotidsorrendje csak kevéssé tér el a consensus szekvenciától, és erősségüket tovább fokozza az UAS-ák jelenléte. Ez a tény - valamint sokoldalú szabályozottságuk- igen vonzó kisérleti objektumokká teszik ezeket a promótereket a bakteriális transzkripció regulációjának megismerésére vonatkozó kutatások szempontjából, és kézenfekvően felmerül gyakorlati felhasználásuk lehetősége is, expressziós vektorok kifejlesztésére.

2.6. Expressziós vektorok

Az idegen gének kifejezésére alkalmas expressziós vektorok kétfélék lehetnek, ugymint integrációs vektorok -melyek beépülnek a kromoszómába- valamint autonom replikálódó vektorok -melyek a kromoszómától függetlenül, önállóan léteznek egy vagy több kópiában a sejtben. Jelen összefoglalóban a második kategóriába tartozó (plazmid) vektorokra koncentrálok.

Tetszőleges idegen fehérje túltermeltetésének szándéka esetén számos körülményre szükséges tekintettel lennünk:

a) A sejt életképessége ne csökkenjen számottevően.

b) Biztosítani kell a plazmid konstrukció stabil és változatlan fennmaradását a sejtben.

c) Elegendő mennyiségű specifikus mRNS-nek kell szintetizálódnia.

d) Az mRNS bomlás felezési ideje lehetőleg legyen minél nagyobb.

e) Az mRNS transzlációs efficienciája legyen minél nagyobb, vagyis egységnyi mennyiségű specifikus mRNS-ről egységnyi idő alatt minél több fehérje íródjon át.

f) Az idegen fehérje degradációja legyen a lehető legalacsonyabb.
g) A fehérje natív formában történő kinyerése ne ütközzön akadályokba, például lehetőség szerint ne képezzen a fehérje zárványtestet (inclusion body) a sejtben és a feldolgozás (downstream processing) egyszerüen megvalósítható legyen.

Az alábbiakban pontról pontra kívánom megválaszolni, hogy az egyes követelményeket milyen eljárások alkalmazásával valósíthatjuk meg:

a) és b) A sejteket (mint erről a későbbiekben még többször lesz szó) az idegen fehérje túltermeltetése többnyire jelentősen megterheli. Erős szelekciós nyomás hat a túltermelés ellen, igy könnyen keletkeznek olyan mutációk, melyek következtében a sejt felszabadul a túltermelés "kötelessége" alól. A megoldást jelentheti olyan plazmid konstrukciók megalkotása, amelyekről az idegen fehérje szintézisét indukálható promoter vezérli. Ebben az esetben ugyanis -a promóter represszált állapotában- az idegen gén jelenléte semmilyen hatással sincs a sejt növekedésére. A promótert a fermentáció tetszőleges időpillanatában "bekapcsolhatjuk", például a sejtkultúra növekedési görbéjének olyan pontján, ahol a mutánsoknak már nincs lehetőségük (idejük) túltermelő társaik túlnövésére.(Az 5.3. fejezetben egy ilyen indukálható promótert hordozó expressziós vektorcsalád kifejlesztését tárgyalom.) (Boros és mtsai 1986, Lukácsovich és mtsai 1990/a, 1990/b)
(A plazmidvesztés jelenségéről és a plazmidok stabil fenntartásának lehetőségeiről a baktériumsejtben az 1.4. fejezetben szólok.)

c) A sejtben egy adott pillanatban szintetizálódó specifikus mRNS mennyiségét az idegen gén sejten belüli kópiaszáma (vagyis a plazmidkópiaszám) és a transzkripció iniciációjának intenzitása (vagyis a promótererősség) határozza meg. Tehát az idegen génünket -lehetőség szerint- nagy kópiaszámú plazmidon, erős promótert követően kell klónoznunk.

d) Az mRNS-ek turnoverének sebességét kevéssé ismert tényezők

befolyásolják. Annyi látszik bizonyosnak, hogy a molekula másodlagos és harmadlagos szerkezetének komoly szerepe van a lebomlás féléletidejének a meghatározásában (valószínüleg a stabil RNS-ek is komplex másodlagos struktúrájuknak köszönhetik kiemelkedő rezisztenciájukat), messze járunk azonban még attól, hogy stabilitást biztosító nukleotidsorrendű mRNS-ek tervezhetők legyenek.

e) Az mRNS transzlációs hatékonyságát elsősorban az un. riboszómakötőhely (vagy Shine-Dalgarno szekvencia) minősége határozza meg (Shine és Dalgarno 1974, Gold és mtsai 1981). A riboszómakötőhely néhány nukleotid hosszúságú, puringazdag DNS szakasz az mRNS 5' nem transzlálódó részén, 5-12 bp.-ral megelőzve a transzlációs iniciációs (általában AUG) kodont. Ez a szekvenciarészlet a riboszóma kisebbik alegységében található 16S rRNS egy részével (anti-Shine-Dalgarno szekvencia) komplementer (Shine és Dalgarno 1974). Tágabb értelmezésben a riboszómakötőhelyhez tartoznak további DNS szakaszok is, amelyek részint a leader, részint a fehérje kódoló régióban helyezkednek el és lazább komplementaritást mutatnak a 16S rRNS megfelelő szakaszával (Scherer és mtsai 1980). A transzláció során a Shine-Dalgarno és az anti-Shine-Dalgarno szekvencia bázispárosodással történő kapcsolódása pozícionálja az mRNS-t a riboszómán. Igy könnyen megérthető, hogy a transzláció hatékonyságát jelentősen befolyásolja, hogy a riboszómakötőhely szekvenciája milyen mértékben tér el a consensustól, illetve milyen távolságban van az AUG kodontól.

Hasonlóképpen a lebontáshoz, a transzlációs hatékonyságot is jelentősen befolyásolja az mRNS molekulának (különösen a molekula 5' nem transzlált részének) a másodlagos szerkezete, azonban itt is a fentiekben leírtak érvényesek, vagyis predikciókat nemigen tehetünk. (Bizonyos laza, empirikus összefüggést sikerült megállapítani az esetek egy részében a transzláció hatékonysága és a Shine-Dalgarno szekvencia, valamint az AUG kodon exponáltsága között (Boyen és mtsai 1982). A transzláció

hatékonyságának a rovására ment, ha ezek a funkcionálisan fontos szekvenciák a legkisebb szabadenergiájú másodlagos szerkezetnek egy bázispárosodott részére estek.) Ugyancsak befolyásolja a transzlációs hatékonyságot, hogy az idegen gén kodon használata milyen mértékben tér el a gazdasejtétől. (Ez utóbbi probléma szintetikus gén esetén könnyen áthidalható.)

f) Az idegen fehérjét a baktériumsejt "karbantartó" rendszere sokszor károsodott saját fehérjének véli, és igy gyorsan eltakarítja. Az elöregedett (vagy hődenaturálódott) fehérjék lebontását a sejtben specifikus proteázok, az un. lon proteázok végzik, amelyek egyben a hősokk válasz terminális lépéseit is megvalósítják. Kézenfekvő lehetőség -amellyel a biotechnológusok gyakran élnek is- lon proteáz minusz törzsek használata a túltermeltetéshez. Még jobb eredményt lehet elérni, ha a sejtek - a lon gének mellett - defektívek a hősokk válasz indukciójához nélkülözhetetlen hptR regulátor génben is (Baker és mtsai 1984). Egy másik "trükk" az idegen fehérjét sajátnak maszkírozni azáltal, hogy a fehérje N-terminális részéhez egy bakteriális fehérje darabot kapcsolunk. Ez un. fúziós vektorokkal érhető el. Néhány konkrét példát az 5.3. fejezetben említek.

g) A problémának általános megoldása nemigen van. Az inclusion body képződés mértékét a sejtkultúra növesztési körülményeinek változtatásával az esetek egy részében befolyásolni lehet, a downstream processing egyes lépéseit feladatonként (az idegen fehérjétől függően) kell megtervezni. (Egyes konkrét lehetőségekről az 5.3. fejezetben lesz szó.)

2.7. Plazmidstabilitás

2.7.1. Kompatibilitás, inkompatibilitás

A baktérium sejtekben olyan plazmid DNS molekulák tudnak stabilan fennmaradni, melyek amplifikálására a sejt kifejlesztette a megfelelő replikációs mechanizmust. Az eltérő

típusú replikációs origóval rendelkező plazmidok átírását különböző replikációs rendszerek végzik, melyek biztosítják, hogy a különböző típusú plazmidok mennyiségi aránya a sejten belül változatlan maradjon, másszóval az ilyen plazmidok egymással kompatibilisek. Azonos típusú replikációs origóval bíró - valamilyen egyéb tulajdonságukban azonban különböző- plazmidokat a replikáció során a sejt nem képes egymástól megkülönböztetni, így a statisztikus ingadozás következtében az utódsejtek már más-más arányban tartalmazzák a kétféle plazmidot, mint az anyasejt. Néhány sejtosztódás után ez a jelenség oda vezet, hogy a sejtek döntő hányada vagy csak az egyik, vagy csak a másik plazmidot hordozza. Vagyis az azonos replikációs origójú plazmidok inkompatibilisek egymással. (Az eddig elmondottakból világosan kitűnik, hogy a plazmid inkompatibilitás jelensége nem feltételez valamiféle aktív mechanizmust a sejt részéről, éppen ellenkezőleg, a sejt nincs birtokában olyan "eszközöknek" amelyekkel megakadályozhatná az egyik, vagy a másik plazmidfajta kihigulását.) Mindezt azért említettem, mert a túltermelő baktériumsejtekben sok tekintetben a plazmid inkompatibilitás jelenségével analóg folyamat játszódik le. Az idegen gén túltermelésének képességét -valamilyen mutáció következtében- elveszítő plazmid inkompatibilissá válik az ugyanabban a sejtben található, de még "érintetlen" plazmidokkal szemben, ezáltal a sejtosztódások során valamelyik plazmid szükségszerűen elvész. (Az általános szelekció (pl. valamilyen antibiotikum alkalmazása) ugyanis nem tesz különbséget a kétféle plazmid között.) Könnyen megérthető az is, hogy miért a túltermelésre még képes plazmid lesz a "vesztes" ugyanis -mint már említettem- a sejt szempontjából fölösleges idegen fehérje túltermelése rendkívül megterhelő, igy azok a sejtek kerülnek szelekciós előnybe, amelyekből ez a plazmid tűnt el. Az 5.4. fejezetben tárgyalok egy lehetséges módszert a probléma kivédésére. (Lukácsovich és Venetianer 1989.)

2.7.2. A plazmidok stabilizálásának lehetőségei

Amennyiben semmilyen szelekciós nyomást nem alkalmazunk a plazmidvesztés ellen, akkor a sejtek képesek nem csak plazmidállományuk megváltoztatására, hanem valamennyi plazmidjuk elvesztésére is. A legegyszerűbb lehetőség ennek megakadályozására az antibiotikum szelekció. (Amennyiben a plazmid rendelkezik valamilyen antibiotikum rezisztencia génnel, akkor az illető antibiotikum jelenlétében csak a plazmidot hordozó sejtek képesek növekedni). Ennek a megoldásnak azonban - ipari méretű fermentálások esetén- határt szab költséges volta, igy többnyire nem alkalmazható. Ezért régebbóta folynak kísérletek egyéb megközelítések kidolgozására.

Az egyik ilyen lehetőséget jelenti un. "öngyilkos" (suicide) plazmidok alkalmazása. Ilyen rendszereket írtak le Ogura és Hiraga (1983/a, 1983/b), Jaffé és mtsai (1985), Gerdes és mtsai (1986) valamint Bravo és mtsai (1988). Ezek a plazmidok -valamennyi vizsgált esetben- két génből álló stabilizációs rendszerrel rendelkeznek. A két gén egyike "gyilkos" (killer) funkciójú -a gazdasejtre rendkívül toxikus- fehérjét kódol, a másik géntermék pedig valamilyen módon képes a killer funkció gátlására. A szupresszió történhet fehérjeszinten, mint a ParD rendszer esetében (Bravo és mtsai 1988), vagy antisense RNS-el megvalósított transzlációgátlás formájában a ParB régiót hordozó plazmidoknál (Gerdes és mtsai 1986). Mindkét esetben a szupresszor molekula lebomlási sebessége jóval nagyobb a killer funkciót megvalósitó géntermékénél, igy a plazmidvesztés után röviddel aktivizálódik a killer funkció, és elpusztítja a gazdasejtet.

Egy másik lehetőség a plazmidvesztés megakadályozására olyan gazdatörzs-plazmid párok létrehozatala, amelyek esetében a baktériumsejt valamelyik létfontosságú génje a kromoszómáról hiányzik, ellenben a plazmidon megtalálható ugyanennek a génnek egy működőképes kópiája. Ennek a stabilizációs elvnek a

megvalósítására az 5.4. fejezetben mutatok be egy példát.

2.8. Mutációs gyakoriság a sejtben

Az élőlények genetikai anyagát érintő mutációkat két csoportba oszthatjuk: indukált és spontán mutációk. Míg az indukált mutációk valamilyen külső behatás (pl. UV-sugárzás, kémiai mutagének stb.) következtében keletkeznek, addig a spontán mutációk látszólag ok nélkül, a sejt információt megőrző illetve megduplázó (replikáció) mechanizmusainak a tévedése folytán jönnek létre. (Más kérdés, hogy bizonyos százalékos arányú tévedés megengedése a sejt részéről sokszor "szándékosnak" tűnik.) Hosszú időn át általánosan elfogadott elmélet szerint a mutációk -bizonyos un. forró pontokat (hot spot) kivéve, ahol a mutációs gyakoriság jóval nagyobb- random eloszlásban jelentkeznek a genetikai információt hordozó DNS molekula teljes hosszában, tekintet nélkül arra, hogy az adott változás előnyös, vagy hátrányos a sejt számára. Mint az 6.5. fejezetben leírtakból kitűnik, újabban többen támadják ezt az elképzelést.

2.8.1. A mutációs frekvencia meghatározása

Minthogy a mutációk jelentős része nem közömbös (neutrális) a sejt számára, hanem az adott környezet vonatkozásában szelekciós előnyt, vagy hátrányt jelent a vad típusú sejtekkel szemben, ezért egy adott tulajdonságra nézve mutáns sejtek százalékos aránya a sejtkultúrában nem tükrözi szükségszerűen a mutáció előfordulási gyakoriságát. A probléma megkerülésére Luria és Delbrück (1943) kidolgozták un. fluktuációs módszerüket, melynek lényege a mutánsok számának meghatározása -minél több független kisérletben, minél alacsonyabb sürüségű sejtkultúrával dolgozva- és az eredmények átlagolása. Ekkor -a nagy számok törvényét kihasználva- a véletlen szerepe kiküszöbölhető, és a statisztikai eloszlás

átlagértéke helyes eredményt ad.

2.8.2. A hibára hajlamos javító mechanizmus (error-prone repair)

A baktériumsejtek genetikai anyaguk károsodására komplex módon -az un. SOS-válasz keretében- reagálnak. Az SOS-válasz integráns része az un. error-prone javító mechanizmus indukálódása amely -a DNS replikációját végző DNS-polimeráz III enzim "átíráshűségét" (proofreading) lazítva- lehetővé teszi a DNS-en keletkezett lyukak "befoltozását" anélkül, hogy ehhez a másik szál templátként szolgálna. Eközben természetesen mutációk keletkeznek, nemcsak a hibák helyén, hanem -az enzim megváltozott aktivitása következtében- a kromoszóma egyéb pontjain is. A DNS-polimeráz III templátfüggőségének csökkenését -részleteiben nem kielégítően ismert módon- ugyanaz a RecA protein okozza, amely fehérje egyebekben is rendkívül széleskörüen vesz részt az SOS-válasz szabályozásában (Walker 1987). A recA fehérjéhez -a DNS rekombinációs eseményekben játszott (elsődlegesen felismert) szerepén kívül- az SOS válasz indukciójának kulcsfontosságú lépése köthető:

A DNS degradációját jelző (jelenleg ismeretlen) szignál hatására a recA fehérje aktiválódik és enzimatikusan elhasítja a lexA represszort, amely fehérje felelős a recA valamint az egyéb SOS-gének (umuDC, uvr A, B és C, ssb stb.) transzkripciójának gátlásáért. Minthogy a recA fehérje a saját represszorát inaktiválja, igy a pozitív visszacsatolás következtében koncentrációja rendkívül gyorsan emelkedik, ezáltal a sejt igen gyorsan képes reagálni a genetikai anyagának integritását fenyegető történésekre. Hasonlóképpen fontos hogy a vészhelyzet elmultával a sejt anyagcseréje hamar visszatérhessen a "normális kerékvágásba". Ezt a követelményt valósítja meg az a "megoldás", miszerint a lexA protein egyben saját magának is represszora. Így az SOS-válasz során a represszor szintézise is fokozódik, de a

represszor molekulákat a nagymennyiségű, aktivált recA azonnal elhasítja. A "készültség" elmultával azonban -a recA molekulák inaktiválódása folytán- igen hamar nagy mennyiségű lexA keletkezik, amely aztán gyorsan "elhallgattatja" az SOS-géneket. Mindezek alapján nem meglepő, hogy a mutációs gyakoriság változásaival összefüggő folyamatokban -mint arra a dolgozatom 5.5.6. fejezetében említett példa is bizonyíték- a recA géntermék szerepe legtöbbször tettenérhető (Lukácsovich és Venetianer 1991).

3. Célkitűzések

A kutatócsoport - amelynek 1982-ben a tagjává váltam -, addigra már több mint egy évtizede tanulmányozta az Escherichia coli baktérium riboszómális RNS transzkripciójának a szabályozását. A csoporton belüli szűkebb munkamegosztás az rrnB operon promótereinek vizsgálatát tette feladatommá. Munkám során elsősorban az alábbi kérdésekre igyekeztem választ kapni:

1.) A sejt fiziológiai állapota és növekedési körülményei hogyan hatnak a promóterek aktivitására, (az addig megismert szabályozási mechanizmusok milyen további részletekkel egészíthetők ki ?

2.) Hogyan befolyásolja a promóterek szerkezete in vivo (és in vitro) aktivitásukat ?

3.) Miképpen lehet a megszerzett ismereteket gyakorlati célokra (pl. expressziós vekterrendszer kifejlesztésére) felhasználni ?

Az előre kitűzött célok mellett a munka során egy további érdekes probléma is felmerült, amelynek szintén nyomába eredtünk.

4. Anyag és módszer

4.1.1. Vegyszerek

Agaróz (Sigma)

Akrilamid (Serva vagy Reanal,ez utóbbit háromszor kristályositottuk át kloroformból)

Biszakrilamid (Serva)

Ammónium-peroxi-diszulfát,APDS (Sigma)

Karbamid (Merck)

Tetrametil-etilén-diamin,TEMED (Merck)

Hidrazin (Eastman Kodak)

Dimetil-szulfát (Merck)

Piperidin (Merck)

Formamid (Merck)

Etilén-diamin-tetra-acetát,EDTA (Merck)

Bacto-tryptone (Difco)

Bacto-yeast-extract (Difco)

Bacto-agar (Difco)

Kloramfenikol (Serva) (leggyakrabban 50 ug/ml koncentrációban használtuk)

Ampicillin (Sigma) (leggyakrabban 100 ug/ml koncentrációban használtuk)

Kanamicin (Sigma) (leggyakrabban 50 ug/ml koncentrációban használtuk

Szerinhidroxamát (Sigma)

Izopropil-béta-D-tiogalaktopiranozid,IPTG (Boehringer)

5-bromo-4-kloro-3-indolil-béta-galaktozid,x-gal (Boehringer)

Orto-nitro-fenil-galaktozid,ONPG (Boehringer)

Etidiumbromid (Sigma)

Nitrocellulóz filter (Schleicher-Schüll)

dNTP-k és ddNTP-k (Worthington)

pd(N)6 oligoprimer (Pharmacia)

A kisérletekhez felhasznált puffereket és egyéb oldatokat a Merck, a Sigma és a Serva cégek által forgalmazott vegyszerekből készitettük.

4.1.2. Táptalajok

YTB tápfolyadék (1l) : 5g bacto-yeast-extract,10g bacto-tripton,5g NaCl
YTA lemez : YTB tápfolyadék + 1.5% agar(Difco)
M9 glükóz minimál lemez : 1l M9 sókeverék (6g Na_2HPO_4, 3g KH_2PO_4, 1g NH_4Cl, 0.5g NaCl), 15g minimál agar, 1ml 1M $MgSO_4$, 1 ml 0.1M $CaCl_2$, 1 ml tiamin-HCl, 10 ml 20% glükóz

4.1.3. Enzimek

A felhasznált restrikciós endonukleázok túlnyomó részét az MTA SZBK Biokémiai Intézetében preparálták. Kivételt képez a Cla I, FnuD II, Taq I és Nsi I restrikciós enzim (New England Biolabs)
Polinukleotid kináz (MTA SZBK Biokémiai Intézet)
T4 DNS ligáz (MTA SZBK Biokémiai Intézet vagy New England Biolabs)
DNS polimeráz Klenow fragment (MTA SZBK Biokémiai Intézet)
Bakteriális alkalikus foszfatáz (Worthington)
Lizozim (Serva)
Proteináz K (Merck)

4.2. Baktériumtörzsek, fágok, plazmidok

E. coli törzsek:	jellemzők	hivatkozás
HB101	hsds(rBmB),rec A,ara, pro A,lac Y,gal K rpsl,xyl,mtl,sup E	Boyer és Roulland-Dussoix (1969)

JM107	end A1,gyr A96,thi, hsd R17,sup E44,rel A1 lambda minusz,delta (lac-pro AB),(F'traD36, pro AB,lac I^q,Z delta M15)	Yanisch-Perron és mtsai (1985)
C600	F minusz,thi 1,thr 1, leu B6,lac Y1,ton A21, sup E44	Appleyard (1954)

fágok:

M13 mp18,mp19 Yanisch-Perron és mtsai (1985)

plazmidok:

pBR 322	Ampicillin,Tetraciklin rezisztens	Bolivar és mtsai (1977) Sutcliffe (1978)
pKK 223-3	Ampicillin rezisztens	Brosius és Holy (1984)
pUC 18,19	Ampicillin rezisztens	Yanisch-Perron és mtsai (1985)

A munka során a kutatócsoportunkban előállitott plazmidokról az "Eredmények és megfontolások" fejezetben szólok részletesen.

4.3. Módszerek

4.3.1. Plazmid DNS tisztítása

A plazmidtisztítást legtöbbször az alkáli lízis módszerével

végeztük (Birnboim és Doly 1979). Bizonyos esetekben- ha a DNS degradációját minimálisra kívántuk csökkenteni- egyéb plazmidtisztítási módszereket is alkalmaztunk (Maniatis és mtsai 1982, Humphreys és mtsai 1975, Klein és mtsai 1980). Amennyiben a plazmid DNS-t rádióaktív jelölésre vagy klónozásra kívántuk felhasználni, úgy tovább tisztítottuk, legtöbbször Sephacryl S-1000 oszlopon történő gélszüréssel. Ebben az esetben a Sephacryl S-1000 oszlopot az alábbi összetételü pufferrel ekvilibráltuk: 1M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA. A tisztítandó DNS-t 1/100 oszloptérfogatnál nem nagyobb mennyiségben vittük fel az oszlopra, ugyancsak 1M NaCl-ot tartalmazó vizes oldatban.
Az egyes frakciókat 1%-os agaróz gélen megfuttatva teszteltük, majd a tisztának mutatkozó frakciókat összegyüjtöttük és fenol-kloroformos extrahálás után alkohollal kicsaptuk.

4.3.2. M13 replikativ és egyes szálú forma izolálása

1 ml 2*YTB tápfolyadékba 10 ul éjszakán át növesztett gazdasejtet (többnyire E. coli JM 107-et) oltottunk, majd steril fogpiszkáló felhasználásával egy plakkot oltottunk bele.4-6 órás, 37 ^{o}C-on rázatva történő növesztés után eppendorf centrifugában a sejteket kiülepítettük (5 percig).
A replikatív (kettős szálú) forma izolálásakor 100ml 2*YTB tápoldathoz 1ml fágtartalmú felülúszót és 1ml sürü gazdasejtet adtunk. 4-6 órán át 37 ^{o}C-on történő rázatás után a sejteket centrifugálással kiülepítettük és valamelyik standard plazmidtisztítási módszerrel (4.3.1. fejezet) izoláltuk a duplaszálú DNS-t.
Az egyes szálú forma izolálásakor 1 ml felülúszóból kiindulva 200 ul 2.5M NaCl, 20% PEG 600 oldattal kicsaptuk a fágokat. Centrifugálást követően eltávolítottuk a felülúszót (a centrifugálást mégegyszer megismételtük) majd a fágokat 100 ul 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA-t tartalmazó pufferben szuszpendáltuk. A fehérjéket fenolos extrahálással távolítottuk

el, a DNS-t 2.5 térfogat etanollal csaptuk ki.

4.3.3. DNS fragmentumok gélelektroforézise

A duplaszálú DNS fragmentumok elválasztására a Maniatis és mtsai (1982) kézikönyvében leirtak szerint agaróz vagy poliakrilamid géleket használtunk, a fragmentumok méretétől függően. Az elektroforetikus puffer összetétele agaróz gélek esetében rendszerint 25 mM Na-acetát, 5 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl(pH 7.7); poliakrilamid gélek esetében 100mM bórsav, 2mM EDTA és 100mM Tris-HCl (pH 8.3) volt.

4.3.4. DNS fragmentumok visszanyerése gélből

Az izolálandó DNS darabokat -méretüktől függően- agaróz vagy poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk el egymástól. Az egyes fragmentumokat etidiumbromidos festés után hosszú hullámhosszú UV fénnyel történő megvilágitással tettük láthatóvá. A kivánt fragmentum izolálását a gélből Winberg és Hammarskjöld (1980), Tabak és Flavell (1978) vagy Dretzen és mtsai (1981) módszere alapján végeztük.

4.3.5. DNS fragmentumok in vitro jelölése

Magas specifikus aktivitású hibridizációs próbák jelölésénél általában Feinberg és Vogelstein (1983) vagy Hodgson és Fisk (1987) módszerét követtük.
A DNS fragmentumok 5' végjelölését polinukleotid kinázzal a Maxam és Gilbert (1977) által leirt módszer alapján végeztük. Jelölés után a DNS fragmentumot a be nem épült trifoszfátoktól Sephadex G75 oszlopon végzett gélszűréssel választottuk el.

4.3.6. Transzformáció

Cirkuláris plazmid DNS-el vagy ligátummal való transzformáláshoz kompetens HB 101 sejteket Cohen és mtsai (1972), kompetens JM 107 sejteket Hanahan (1983) módszerével készítettünk.200 ul kompetens sejthez 20-50 ng-nyi DNS-t adtunk, 1 órán át 0 ^{o}C-on inkubáltuk, majd 2 percig 42 ^{o}C-os hősokkot alkalmaztunk.1 ml YTB tápoldat hozzáadása után a sejteket 1 órán át 37 ^{o}C-on inkubáltuk, majd 200 ul-nyit -a megfelelő antibiotikummal kiegészitett- YTA lemezre szélesztettünk.

4.3.7. Restrikciós endonukleázok (valamint egyéb "DNS-manipuláló" enzimek használata és a plazmid (illetve fág) konstrukciók fizikai térképezése.

A restrikciós enzimek (valamint a polimerázok, nukleázok, kináz, ligáz stb) használatakor a reakciófeltételeket a New England Biolabs aktuális katalógusában megadott értékek szerint alakítottuk ki.
A Bal 31 exonukleázzal végzett irányított delécióképzés során a plazmidot -a kivánt helyen- egy alkalmas restrikciós endonukleázzal "felnyitottuk", majd a párhuzamos mintákat különböző mértékben higított Bal 31 enzimmel kezeltük. (Alternatív megoldásként az egyes mintákhoz azonos koncentrációban adtuk az enzimet, ellenben az inkubációt különböző időpontokban szakítottuk meg.) Az egyes reakciókból - fenol-kloroformos extrahálás és etanolos kicsapás után- kapott plazmidokat egy második -alkalmas távolságban hasító-, restrikciós enzimmel emésztve állapítottuk meg, hogy melyik az a minta, amelyben az exonukleáz a kívánt méretű deléciót hozta létre.
A fizikai térképezés során a különböző specifitású restrikciós enzimek hasítóhelyeinek pozícióit határoztuk meg a szóbanforgó plazmidon (vagy fágon). A restrikciós enzimekkel végzett egyedi

és többszörös emésztések során keletkező DNS fragmentumok méretéből kiszámítható az egyes hasítóhelyek elhelyezkedése (Smith és Birnstiel 1976).
Sokszor nagy segítséget jelent a DNS fragmentumok rádióaktív végjelölése. Ebben az esetben a jelölt végtől a hasítóhelyig terjedő fragmentum méretét azonosítani tudjuk az autoradiogrammon és igy meghatározhatjuk a méretét.

4.3.8. Southern transzfer és hibridizálás

A DNS átvitelét agaróz gélekből nitrocellulóz filterre, Southern (1975) módszere alapján valósítottuk meg.
A hibridizálás során a nitrocellulóz filtert először 4 órán át kezeltük 65 ^{o}C-on 6SSC-vel (1SSC: 0.15M NaCl, 0.015M Na-citrát) és 5*Denhardt oldattal (1*Denhardt oldat: 0.02%-0.02% BSA,ficoll és polivinilpirrolidon, Denhardt 1966). A jelölt próbát hozzáadás előtt 2 perces forralással denaturáltuk. A hibridizációt általában éjszakán át folytattuk 65 ^{o}C-on, majd a filtert ugyanezen a hőmérsékleten mostuk, először 2SSC, 0.1% SDS majd 0.1SSC, 0.1% SDS oldatokkal. Szárítás után a filtert autoradiografáltuk.

4.3.9. A DNS nukleotidsorrendjének meghatározása

A szekvenciaanalízist részben Maxam és Gilbert (1977), (1980) módszere alapján végeztük, részben a dideoxinukleotid trifoszfátok jelenlétében végrehajtott láncterminációs módszert alkalmaztuk (Sanger 1977, 1980).

4.3.10. Oligonukleotiddal irányított mutagenezis

Az oligonukleotid vezérelte mutagenezist Zoller és Smith (1983), (1984), illetve Carter és mtsai (1985) módszere alapján végeztük.
Az oligonukleotidokat Simoncsits András (MTA SZBK Genetikai

Intézet) szintetizálta. Az oligonukleotidok tervezésekor számítógépes homológiakereséssel győződtünk meg arról, hogy a szekvencia egyéb részein nem található az oligonukleotiddal nagyfokú komplementaritást mutató részlet.

4.3.11. Fehérjemeghatározás

A baktériumsejtek össz-fehérje tartalmának meghatározására Bradford (1976) módszerét alkalmaztuk.

4.3.12. Fehérje gélelektroforézis

A bakteriális fehérjék futtatását SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel Laemmli (1970) módszerének megfelelően végeztük.

4.3.13. In vivo transzkripció

RNS pulzusjelölés céljára -a megfelelő plazmiddal transzformált- E. coli JM 107 sejtek 10 ml-es tenyészeteit növesztettük 100 ug/ml Ampicillinnel és 3 mM IPTG-vel kiegészitett YTB táptalajban. Mikor a tenyészet sürüsége elérte az OD_{550}=0.3 értéket, 0.8 MBeq/ml ^{3}H uridint (spec. act. 742 GBeq/mmol) adtunk a táptalajhoz, majd 1 perces rázatás után a sejtkulturákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. Felolvasztás után a sejteket lecentrifugáltuk és ujra felszuszpendáltuk forró 1% SDS, 10mM Tris-HCl(pH 7.5), 1mM EDTA oldatban. A lizátumot kétszer extraháltuk fenollal, egyszer kloroformmal, majd kicsaptuk 2.5 térfogat etanollal 0.3M Na-acetát jelenlétében. A jelölt RNS-t 80% formamidot tartalmazó 10mM Tris-HCl(pH 7.5), 1mM EDTA pufferben oldottuk fel és 7M ureát tartalmazó 4%-os poliakrilamid gélen futtattuk Maniatis és mtsai (1975) módszerének megfelelően.

4.3.14. In vitro transzkripció

Az in vitro transzkripciót Glaser és Cashel (1979) módszere alapján végeztük.

4.3.15 mRNS koncentrációmérés hibridizációval

A specifikus mRNS sejten belüli koncentrációját Deuschle és mtsai (1986) módszere alapján határoztuk meg.

4.3.16. In vitro komplementáció
(alfa-peptid assay)

Az alfa-peptid koncentráció mérését Miller (1972) módszerének több ponton módositott változatával végeztük.
Az akceptor fehérjét 3mM IPTG-vel kiegészitett YTB táptalajon éjszakán át növesztett E. coli JM 107 sejtekből preparáltuk.
Az alfa-peptid produkáló plazmidokat tartalmazó E. coli JM 107 sejttenyészetet lecentrifugáltuk majd újra felszuszpendáltuk 1 ml I pufferben (0.02M Tris-HCl (pH 7.2), 0.1M 2-merkaptoetanol, 0.01M EDTA, 0.01M NaCl) és autoklávoztuk 122 ^{o}C-on 20 percig. (ez a kezelés az alfa-peptiden kivül gyakorlatilag minden fehérjét inaktivál). A béta-galaktozidáz aktivitás mérése előtt a donor és az akceptor fehérjeoldatok 0.1-0.1 ml-einek keverékét 5 órán át 4 ^{o}C-on inkubáltuk.

4.3.17. Számítógépes elemzések

A DNS szekvenciák analízise során használt számítógépes programokat (homológiakeresés,RNS másodlagos szerkezet meghatározása, restrikciós enzim hasítóhelyek keresése, nyitott leolvasási fázisok keresése, statisztikai programok stb) a konkrét feladatoknak megfelelően írtuk meg és futtattuk le mikroszámítógépeken.

5. Eredmények és megfontolások

5.1.1 A pER-plazmidok előállítása

A dolgozatomban a továbbiakban részletezésre kerülő munkának a tárgyi alapját Boros Imre kollégám teremtette meg, aki a pBR322 plazmidban (Bolivar és mtsai 1977, Sutcliffe 1978) klónozta az rrnB riboszomális RNS operont, az E. coli kromoszóma 7 db. hasonló operonjának egyikét, majd Bal31 exonukleázzal delécíókat képezve eltávolította a 16S és 23S strukturgének döntő részét (Boros és mtsai 1983). Ezt követően hasonló módon további - a transzkripciós szignálok vizsgálatát illetően irreleváns - plazmidrészeket ejtett ki, és a p419-10, p419-13 elnevezésű plazmidokat kapta, melyek egymástól csak abban különböztek, hogy a p419-13 plazmid az rrnBP1 és P2 promótert egyaránt tartalmazta, míg a p419-10 plazmidról egy további deléció a P1 promótert is eltávolította.

A promóterek aktivitásának kvantitativ mérését megkönnyítendő, a továbbiakban a 16S strukturgén elején lévő egyedi restrikciós hasítóhelyeket felhasználva mindkét plazmidba beépített egy 412 bp hosszúságú DNS fragmentumot, amely a pLBU3 plazmidból származott (Gentz és mtsai 1981) és a lac operon szabályozó szekvenciáit (a promóter -10-es régióját, a lac operátort és riboszómakötőhelyet) valamint a lac Z gén első 66 db. aminosavát kódoló ún. alfa-peptid gént tartalmazta. Az így létrejött két plazmid (p827-1 és p828-10) elvben már alkalmas volt a promóterfunkció vizsgálatára - a "markerként" használt alfa-peptid sejten belüli koncentrációjának mérésén keresztül - azonban még mindig egy aránylag hosszú (250 bp-os) DNS szakaszt hordoztak a promóterek és a lac eredetű DNS szekvenciák között. Ez a DNS szakasz többek között tartalmazta a korábban már tárgyalt antiterminációs boxokat (Li és mtsai 1984), valamint egy 100 bp hosszúságú ismeretlen eredetű DNS darabot. Ezért úgy gondoltuk, hogy egyszerűsödik a kép, ha a promóterrégiót és a lac

eredetű szekvenciákat közelítjük egymáshoz. Célunkat a két plazmid Eco RI emésztése, majd Bal31 exonukleázzal történő delécióképzés segítségével értük el. Végül a plazmidokat T4 DNS ligázzal újból gyűrűvé zártuk. Olyan kolóniákat kerestünk, melyekben az alfa-peptid aktivitás kimutatható volt, vagyis az exonukleáz emésztés feltehetően épen hagyta a promóter struktúrákat. Az eljárás végeredményeképpen kapott plazmidokat pER-plazmidoknak neveztük.

A pER plazmidok előállításának útját az 1. ábra mutatja. A pER-plazmidok egyes reprezentánsai természetesen különböző hosszúságú riboszomális leader szekvenciát (a promótereket közvetlenül követő DNS szakaszt) hordoztak, attól függően, hogy a Bal31 enzim az emésztés során hol állt meg. A deléciók pontos végpontjait Maxam és Gilbert (1980) módszere alapján végzett szekvenciázással állapítottuk meg.

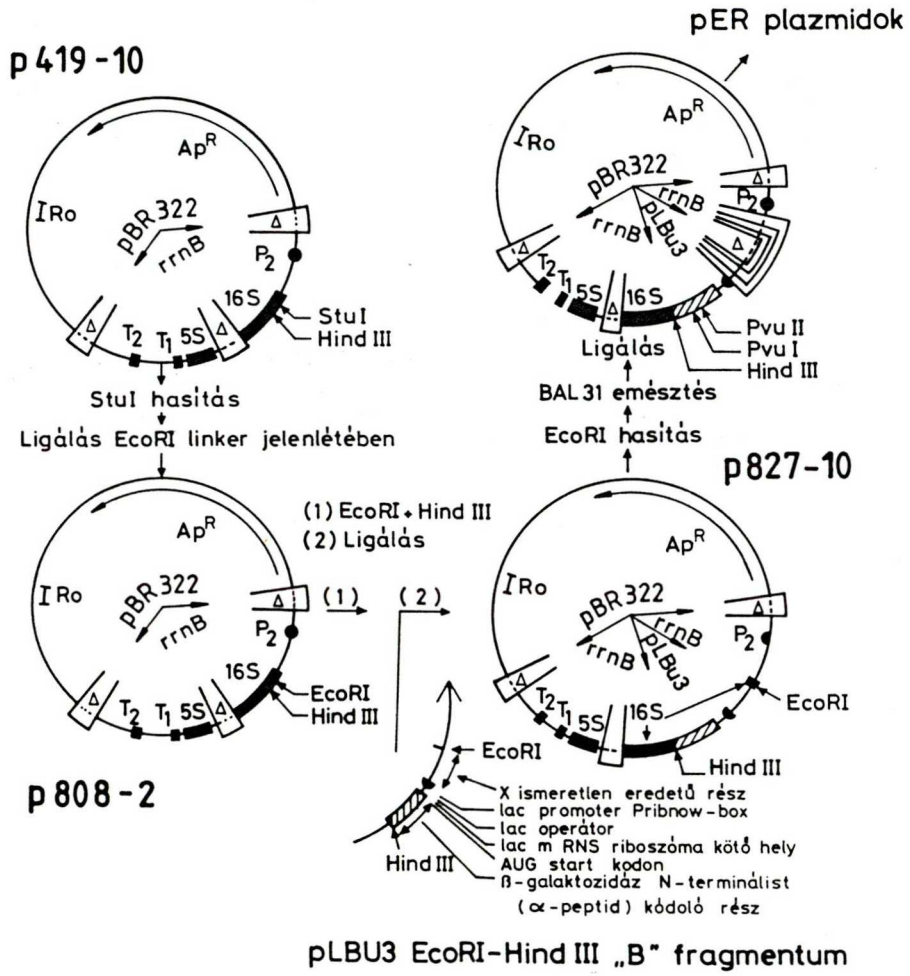
Korábban Boros Imre hasonló módon az előző delécíókat is "átszekvenciázta", így a pER plazmidok teljes nukleotid sorrendje ismert. Ezek a plazmidok igen alkalmas tesztrendszerek az rrnB promóterek működésének in vivo (és in vitro) vizsgálatára. A teljes operonon folyó RNS transzkripció ugyanis a kromoszomális operonokéval azonos terméket ad, így a plazmidon lévő promóterek aktivitása nem különíthető el azokétól. A riboszomális RNS-ek nem funkcionálnak mRNS-ként, ezért a promótereket követően nem találunk - a transzlációt lehetővé tevő - riboszómakötőhelyet. A klónozott lac operon fragmentumon lévő riboszómakötőhely ezt a "hiányosságot" szünteti meg, és lehetővé teszi az átíródott alfa-peptid gén transzlációját.

5.1.2 Az alfa-peptid, mint "marker"

Az alfa-peptid gén használata markergénként - promóterek funkciójának vizsgálatára - több szempontból is előnyös. A géntermék igen kisméretű és lebomlása a sejtben rendkívül gyorsan végbemegy. Az igen rövid felezési idő következtében a sejt

1. ábra

A pER-plazmidok létrehozása



Jelölések :

Vastag fekete vonal : rRNS kódoló régió

Harántcsíkozott téglalap : alfa-peptid kódoló régió

Δ : deléciók

aktuális alfa-peptid koncentrációja hűen tükrözi a promóterek aktivitásában bekövetkező változásokat. Vagyis az alfa-peptid koncentráció változásának a feltüntetése a tenyésztési idő vagy a sejtsűrűség függvényében, a promóteraktivitás differenciális görbéjét adja (hasonlóan az RNS szinten történő mérésekhez), míg stabil fehérje esetében integrál görbét kapnánk, amelyből nehezebben lehet következtetni az aktivitásváltozások pontos időbeli lefolyására.

Az alfa-peptid ugyan önmagában nem rendelkezik enzimaktivitással, azonban képes az N-terminálisán deléciós béta-galaktozidáz enzim aktivitásának a helyreállítására (Ullmann és Perrin 1970). Ez a komplementáció megtörténhet in vivo és in vitro egyaránt. Az E. coli ED8800 törzs, valamint a JM törzsek hordoznak ilyen defektiv béta-galaktozidázt kódoló gént. A kísérletek döntő többségét JM107 tözsben végeztük. A JM törzsek használatát az is indokolja, hogy bennük a lac represszor protein túltermelődik (lac I^q genetikai markerrel rendelkeznek) és ezáltal a pER plazmidokban az alfa-peptid gén transzkripciója laktóz vagy IPTG inducer távollétében nagymértékben gátolt, ugyanis a lac represszor fehérje a lac operátor szekvenciához kötődik és akadályozza a gén átírásában az RNS polimerázt. Így in vivo méréseink során IPTG hozzáadásával pontosan megtudjuk határozni a kísérlet kezdetét jelentő t=o időpontot.

A béta-galaktozidáz aktivitás a sejtben jól detektálható, x-gal indikátor lemezen (a pozitiv klónok kék színűek) és folyékony táptalajon egyaránt. Ez utóbbi esetben ONPG szubsztrátot használtunk, amely a sejtek enyhe kloroformos kezelése után átdiffundál a sejtfalon. Az enzimreakciót követően keletkező termékek egyike intenziv sárga szinű, spektrofotometriásan 420 nm-en jól mérhető. Kvantitativ mérésekre az ún. komplementációs tesztet használtuk. Az in vitro komplementációs tesztet Miller (1972) módszere alapján végeztük, az eljárás részletes leírása az Anyag és Módszer fejezetben található. A szubsztrát ekkor is ONPG volt, az enzimreakciót spektrofotometriásan mértük. Itt

szükséges megemlíteni, hogy az alfa-peptid in vitro komplementációs teszt - valószínűleg a rendszer két komponensű jellege következtében - csak egy adott kísérlet keretein belül ad reprodukálható eredményeket, vagyis csak összehasonlító mérések elvégzésére alkalmas. Ezért csak az egy-egy kísérleten belüli relativ aktivitásértékeket bírnak jelentőséggel, az abszolut aktivitásértékek nem relevánsak.

5.1.3 A pER-plazmidok promóterszerkezete

A pER plazmidok - már említett - DNS szekvencia analízise alapján megállapítottuk, hogy plazmidjaink - promótereik szerkezete alapján- több csoportba oszthatók.

Az eredetileg csak rrnB P2 promótert tartalmazó p828-10 plazmid "leszármazottai" háromfélék voltak:

1. az exonukleáz emésztés a P2 promótert követően (a transzkripciós kezdőponttól számítva) meghagyott 30-60 nukleotidot a leader régióból, majd a szekvencia ezután folytatódik a lac eredetű DNS szakasszal (pl. pER1 plazmid)
2. az exonukleáz a teljes riboszómális leader szekvenciát eltávolította, azonban meghagyta épen a P2 promótert magát (pER23 plazmid)
3. az emésztés még tovább ment és a P2 promóter -10-es régióját is eltávolította, ennek ellenére ezek a kolóniák alfa-peptid aktivitást mutattak. Az ellentmondást az magyarázta, hogy ezekben a klónokban a lac promóter -10-es régiója nukleotidra azonos pozicióba került, mint előzőleg a P2 promóter megfelelő régiója volt. Vagyis ún. hibrid promóter keletkezett, amelynek -35-ös régiója riboszomális, -10-es régiója viszont lac eredetű. Az ilyen promótert a továbbiakban Rac (Riboszomális+lac) promóternek fogom nevezni (az egyik ilyen plazmid elnevezése pER12).

A kezdetben rrnB P1 és P2 promótert egyaránt tartalmazó p827-1 plazmid származékai között találtunk olyanokat, melyekről a P2 promóter teljes egészében hiányzott és csak a P1 volt intakt (pl.

pER36 plazmid), valamint az előző kategóriák mindegyikének megfelelő plazmidokat, amelyek ráadásul még a P1 promótert is tartalmazták (vagyis P1+P2 vagy P1+Rac tandem promóterekkel rendelkeztek, mint pl. a pER20-as, illetve a pER18-as plazmid.

Az említett plazmidok érintett régióinak szerkezetét a 2. ábra mutatja.

5.1.4. A pER-plazmidok alfa-peptid aktivitásgörbéi

A pER plazmidokkal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid aktivitásának mérése több meglepő eredményre vezetett. Az enzimaktivitást nem egy pontban mértük, hanem éjszakán át növesztett sejtkultúrából 1/50 térfogat inokulummal történő leoltás után, a 100 ug/ml ampicillinnel és 3 mM IPTG-vel kiegészített YTB táptalajon növekvő sejttenyészetekből bizonyos időközönként (általában félóránként) mintákat vettünk és a sejttömeggel osztott alfa-peptid aktivitásokat (vagyis az ún. specifikus aktivitásértékeket) a sejtsűrűség vagy az idő függvényében ábrázoltuk. Ezeket a görbéket - nem egészen helyesen - kinetikai görbéknek neveztük. A görbéket - jellegüket tekintve - két különböző csoportba oszthattuk.

Az első csoportba tartoztak a Rac promóteres plazmidok, amelyek alfa-peptid specifikus aktivitásértékei a várakozásnak megfelelően kezdetben gyorsan emelkedtek, majd kevesebb mint egy óra elteltével egy platót (telítési szintet) értek el és attól kezdve nem változtak számottevően. Aktivitásgörbéje alapján ebbe a csoportba tartozónak tekintettük a pER23-as plazmidot is, amelynek azonban az aktivitásmaximuma több mint egy nagyságrenddel magasabb volt a hibrid promóteres klónokénál.

Ettől eltérően - és igen érdekesen - alakultak azoknak a plazmidoknak az aktivitásértékei, melyek a riboszomális promótereket követően hosszabb vagy rövidebb leader szakaszt (legalább 30 bp hosszúságban a P2, illetve 45 bp hosszan a P1 promóter esetében) is megőriztek, vagyis promóterstrukturájuk

2. ábra

A pER-plazmidok promóterszerkezete

rrnB P1

TATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAACGGCAAACACGCCGCCGGGTCAGCGGGGTTCTCCTG

rrnB P2

TATTATGCACACCCCGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCACTGCTCTTTAACAATTTATCAGA

lac Pr.

TATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG

pER36

TATAATGCGCCACCACTGACACGGAACAACGGCAAACACGCCGCCGGGTCAGCGGGGTT------
----------GATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG

pER1

TATTATGCACACCCCGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGC----------
----------TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG

pER20

TATTATGCACACCCCGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCACTGCTCTTTAACA----------
----------GGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG

pER12 (és pER18)

TAT----------GTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG

pER23

TATTATGCA----------TGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATG

A promóterek -10-es régióit és az alfa-peptid gén iniciátor kodonját aláhúzás jelzi. A transzkripciós iniciációs nukleotidokat vastagabb betüszedés mutatja.

alapján a P1 promóteres vagy a P2 promóteres csoportba tartoztak. (Ezen csoportok egyes reprezentánsai a pER36, illetve pER1-es plazmidok, helyesebben az ezekkel a plazmidokkal transzformált sejtek).

Az említett klónok alfa-peptid specifikus aktivitása a leoltás után kezdetben meredeken emelkedett, kb. egy óra elteltével aktivitásmaximumot ért el, majd igen gyorsan egy alapszintre esett vissza. Az aktivitásmaximum (peak) és az alapszint értékének hányadosa plazmidonként változott, de legtöbb esetben megközelítette vagy meg is haladta az egy nagyságrendet. A különböző aktivitásgörbék a 3. ábrán láthatók.

5.1.5. Promóterinterferencia

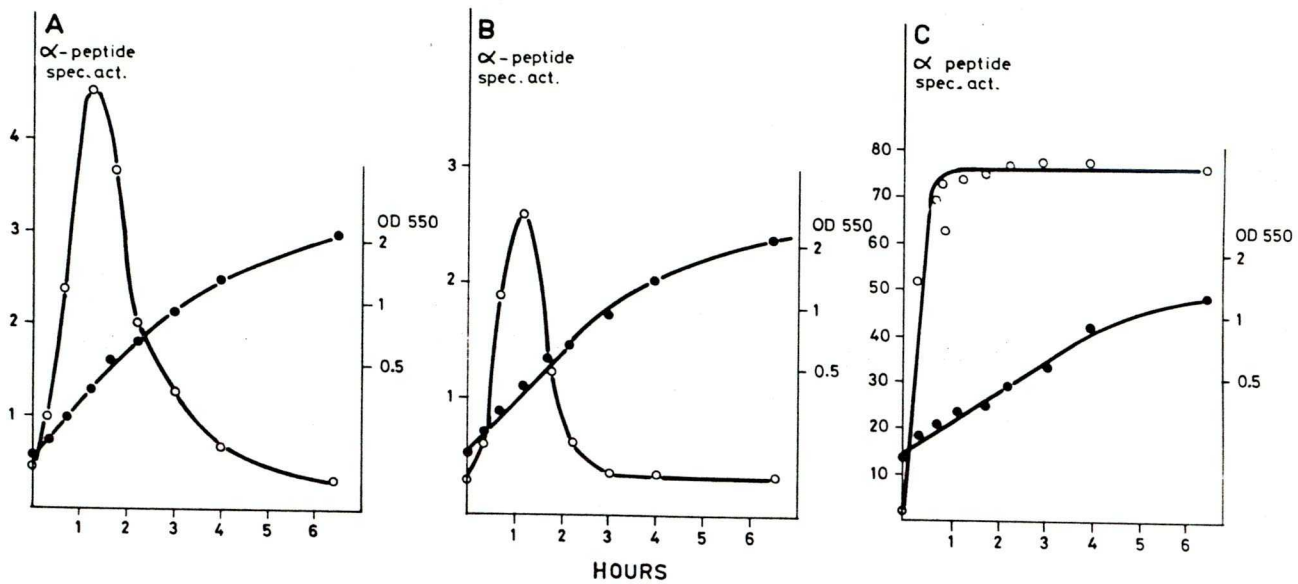
A konkrét adatok említése nélkül, röviden szeretnék kitérni a két promóteres plazmidokat hordozó, vagyis a P1+P2, illetve P1+Rac csoportba tartozó klónok viselkedésére.

Kinetikai görbéik (alfa-peptid aktivitásgörbéik) jellege mindig a második promóternek megfelelően alakult, mintha a P1 promóter jelen sem volna, annak ellenére, hogy a P1 promóter bizonyíthatóan aktiv volt ezekben a klónokban is (a P1 specifikus transzkriptum autoradiográfiásan kimutatható volt). Vagyis, míg a P1+P2 promóteres klónok alfa-peptid aktivitása a korai maximum elérése után gyorsan csökkent, addig a P1+Rac csoportba tartozó klónok "Rac jellegű" - telítési görbe szerű - kinetikát mutattak.

Még érdekesebb eredményre vezetett az egyes két promóteres klónok aktivitásértékeinek összehasonlítása a megfelelő egy promóteres klónokéval (Megfelelő alatt két olyan klónt értek, amelyeknek a plazmid szerkezete csak abban különbözik, hogy az egyik a P1 promótert is tartalmazza, ugyanakkor a P2 (vagy Rac) promótert hordozó és az azt követő részen a két plazmid DNS nukleotidsorrendje teljesen azonos. Ilyen plazmid párok mindkét csoportot illetően rendelkezésre álltak). A P1 promótert is tartalmazó klón aktivitásgörbéje a másik görbe alatt haladt,

3. ábra

A pER-plazmidok alfa-peptid specifikus aktivitásgörbéi



A. A pER20 plazmiddal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásának változása a sejtnövekedés során

B. A pER1 plazmiddal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásának változása a sejtnövekedés során

C. A pER23 plazmiddal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásának változása a sejtnövekedés során

A sejtkultúrákat 1/50 térfogat éjszakán át növesztett inokulummal indítottuk. A táptalaj 3 mM IPTG-vel és 100 ug/ml Ap-el kiegészített YTB volt

o : alfa-peptid specifikus aktivitásértékek

● : sejtsürüség (OD_{550} érték)

vagyis a P1 promóter jelenléte a sejtben mért alfa-peptid aktivitásértékeket csökkentette, annak ellenére, hogy mindkét promóter által szintetizált transzkriptumról a transzláció során egyaránt alfa-peptid keletkezik.

A jelenség csak úgy magyarázható, ha feltételezzük a két promóter intereferenciáját, vagyis hogy a P1 promóterről induló transzkripció gátolja a P2 (vagy Rac) promóter működését és fordítva. Ez a megfigyelés erősen valószínűsíti, hogy a riboszomális RNS operonok tandem promótereire nem az rRNS szintézis mennyiségi fokozása céljából van "szüksége" a sejtnek, hanem finomabb szabályozás valósítható meg általuk, a két promóter más-más feladatra "szakosodott" (A promóterek interferencájára vonatkozóan más kutatók is hasonló eredményre jutottak a miénktől eltérő kísérleti rendszerben) (Glaser és mtsai 1983). A promóterek egymásra hatásának pontosabb megértése további vizsgálatokat tesz szükségessé.

5.1.6. mRNS koncentráció és féléletidő mérések

A továbbiakban az egyszerűbb kísérleti rendszert jelentő egy promóteres klónokra koncentráltunk. Minthogy a sejtben mérhető alfa-peptid szint aktuális értékét komplex szintetikus és lebontó folyamatok eredője határozza meg, ezért a kapott adatok interpretációja gondos analízist igényelt. Legelőször is meg kellett állapítanunk, hogy a megfigyelt különbség valóban a transzkripció szintjén mutatkozik-e. Ismeretes ugyanis -mint az irodalmi összefoglaló 2.6. alatt említettem-, hogy a mRNS 5' nem átíródó részének a másodlagos szerkezete jelentősen befolyásolja az RNS stabilitását és a transzlációs hatékonyságot egyaránt. Minthogy a különböző viselkedést mutató plazmidok esetében a promótereket követő leader régió - amely a mRNS-en az 5' nem átíródó résznek felel meg - jeletősen különbözik, ez a lehetőség sem zárható ki eleve.

A kérdés eldöntésére mintákat vettünk pER1 plazmiddal

transzformált JM107 sejtkultúrából a növekedés korai logaritmikus fázisában (az alfa-peptid aktivitásmaximumának helyén), valamint a késői logaritmikus fázisban (ahol az aktivitás már a minimumszintre esett vissza). A mintákból össz-RNS-t preparáltunk és az Anyag és Módszer fejezetben leírtaknak megfelelően poliakrilamid gélelektroforetikus elválasztást végeztünk (4/a és 4/b ábra). A gélfotón jól látszik, hogy a specifikus RNS transzkriptum az első mintában rendkívül abundáns, a frakcionálatlan össz-RNS preparátumban is jól kivehető, míg a későbbi mintavételek során a transzkriptum eltűnik. (Hasonló kísérletet végezve a pER23 plazmidot tartalmazó klónnal, a transzkriptum végig kimutatható volt.) Egy gélkép vizuális kiértékelése természetesen csak kvalitativ összehasonlítást tesz lehetővé, ezért megkíséreltük a mRNS sejten belüli, egzakt koncentrációmérését Deuschle és mtsai (1986) módszere alapján. A módszer specifikus DNS-RNS hibridizáción alapszik, amely a mRNS és egy rekombináns M13 fág egyszálú DNS-e között valósul meg. A fág DNS a mérendő mRNS-t kódoló gén komplementer (antisense) szálát tartalmazza.

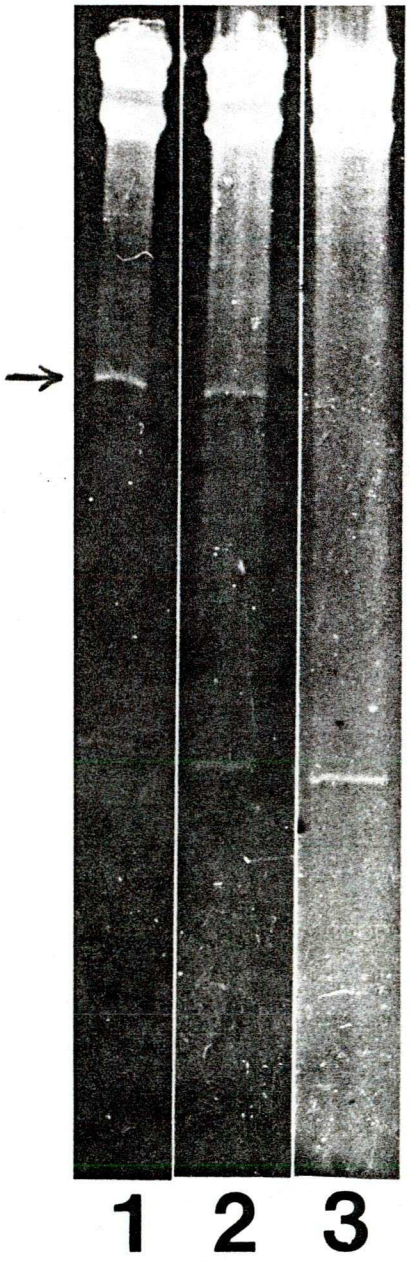
A kísérletet Vladimir Zaweruha végezte el, a három méréssorozat összegzése során kapott eredményeket az 1. táblázat mutatja. Jól látható, hogy a relativ beütésszámok - amelyek a mRNS koncentrációval arányosak - mindkét klón esetében jó egyezést mutatnak az alfa-peptid kinetikai görbékkel. Vagyis az alfa-peptid specifikus mRNS szintjének a változása a növekedés során rendkívül jól korrelál az alfa-peptid aktivitás változásával. Mindez a tisztán transzlációs mechanizmus lehetőségét gyakorlatilag kizárja.

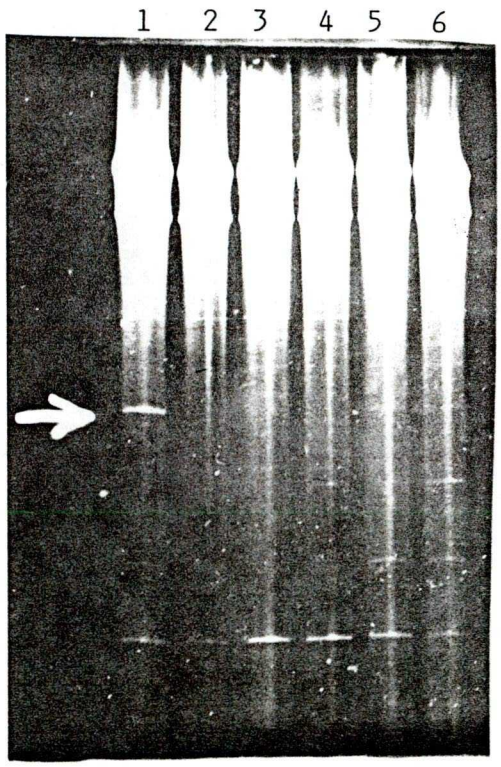
Elméletileg elképzelhető, hogy a sejtnövekedés későbbi fázisában a kétféle mRNS féléletideje eltérő. Konkrét plazmidokat véve alapul, megmagyarázhatja a megfigyelt különbséget, ha például a pER1 plazmid specifikus transzkriptum - a sejtnövekedés késői logaritmikus fázisában - sokkal gyorsabban degradálódik a pER23 specifikus transzkriptumnál. Az 5. ábrán látható, hogy ennek

4. ábra

In vivo transzkripció

Az alfa-peptid specifikus mRNS mennyiségének változása pER1 plazmiddal transzformált JM107 sejtkultúra növekedése során





A sejttenyészeteket 1/50 térfogat -éjszakán át növesztett- inokulummal indítottuk, a táptalaj 3 mM IPTG-vel és 100 ug/ml Ap-el kiegészített YTB volt.

A mintavétel időpontjai:

4/a ábra : a leoltás után 30; 60 és 90 perccel

4/b ábra : a leoltás után 1; 2; 3; 4; 5 és 6 órával

Az RNS mintákat 4%-os PAA-urea gélen futtattuk, majd a gélt ethidium-bromiddal festettük.

Az alfa-peptid specifikus transzkriptumot nyilak jelölik.

1. táblázat

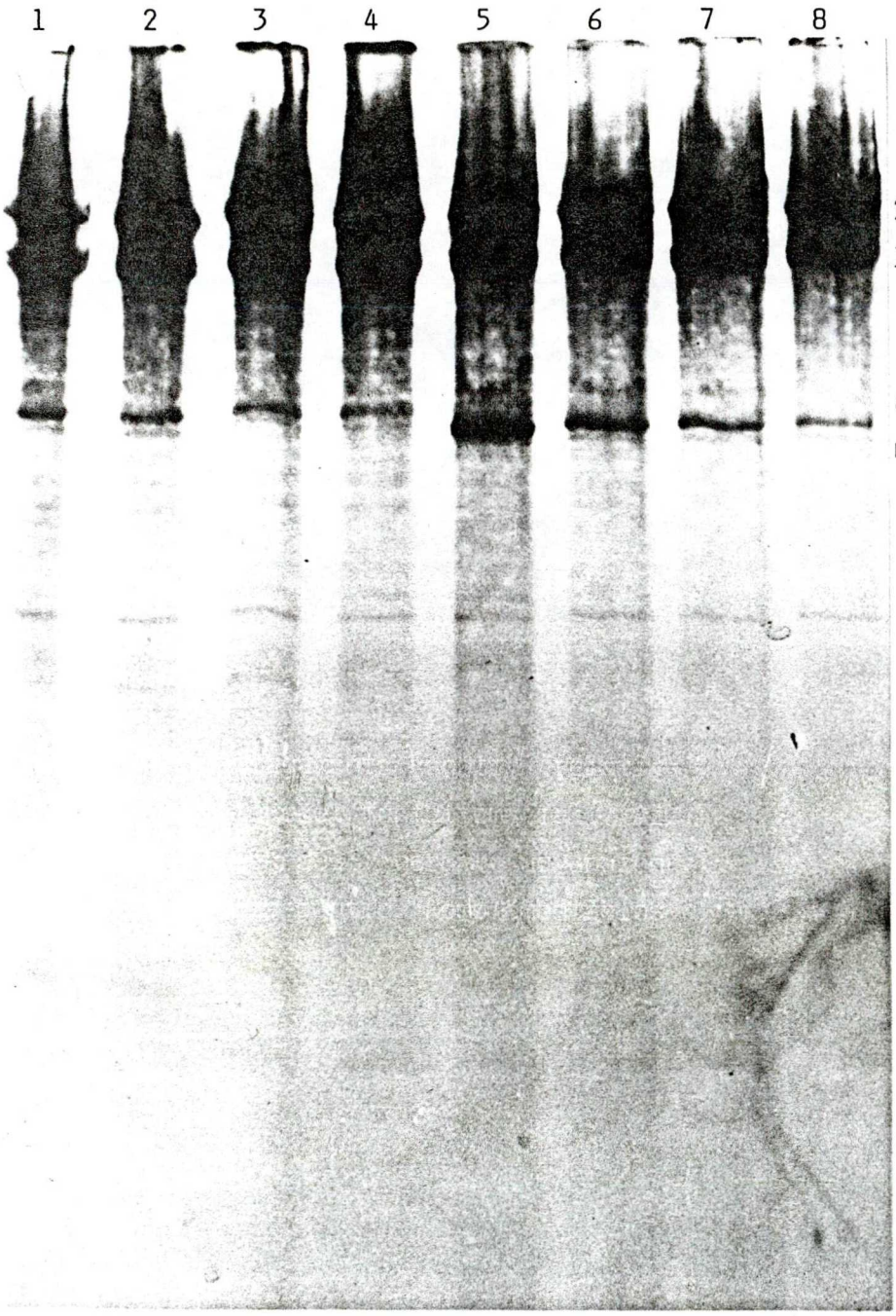
	beütésszám (cpm) / OD_{550}						
t= (percekben)	0	30	60	90	120	150	180
E. coli JM107 transzformálva :							
pER1	80;	512;	836;	475;	321;	210;	150
pER20	120;	976;	1685;	1240;	642;	430;	301
pER23	97;	1020;	1985;	2564;	2612;	2423;	2112

plazmidokkal

A táblázatban a három kísérlet átlagaként kapott relatív (sejtsürüséggel osztott) beütésszámértékeket tüntettem fel. Az RNS izoláláshoz a mintákat a növekedési görbe ugyanazon pontjainál vettük, mint a párhuzamos alfa-peptid komplementációs mérésekhez.

5. ábra

Alfa-peptid mRNS stabilitás



A sejtkultúrákat ml-enként 40 MBq ^{3}H uridinnel (specifikus aktivitás = 742 GBq/mmol) jelöltük 30 percen át, majd 100 ug/ml rifampicin hozzáadása után 0 ; 4 ; 8 és 12 perccel vettünk mintákat az RNS preparáláshoz. Az elektroforézist 4%-os PAA-urea gélen folytattuk.

Minták 1 - 4-ig : A pER1 plazmiddal transzformált sejtből preparált össz RNS.

Minták 5 - 8-ig : A pER23 plazmiddal transzformált sejtből preparált össz RNS.

éppen az ellenkezője az igaz. Rifampicines transzkripciógátlást követően a pER23 plazmidról származó mRNS gyorsabban bomlik le, mint a pER1 mRNS. Vagyis bizonyítottnak vehetjük, hogy az általunk megfigyelt különbség a promóterek eltérő viselkedésének a következménye.

5.1.7. A shift-up reguláció

Megállapításunk szerint a sejtciklus során az rrnB P1 és P2 promóterek aktivitása jelentősen változik, amennyiben a promótereket követő 30-50 bp-nyi DNS szekvencia ép. Ha ezt a -feltehetően egy specifikus szabályozás célpontját (targetjét) alkotó - DNS szakaszt eltávolítjuk (pER23 plazmid), akkor a promóter a növekedés különböző fázisaiban egyforma aktivitással dolgozik. Igaz, hogy ezt az állítást csak a P2 promóter esetében bizonyitottuk kísérletesen, ugyanis nem rendelkezünk a pER23 plazmid P1 promóteres analógjával, amely a leader szekvenciájától megfosztott "csupasz" P1 promótert tartalmazná. Ilyen plazmid ugyan - aránylag nem túl nagy erőfeszítéssel - előállítható lenne, erre azonban nem törekedtünk, ugyanis az általunk talált reguláció különbözik az eddig ismertektől. A riboszomális RNS promótereket érintő ismert szabályozások (stringens kontrol, növekedési ráta kontrol stb.) -mint az irodalmi áttekintésben említettem - mind a P1 promóterekhez köthetők (Gourse és mtsai 1983, Gourse és mtsai 1986). Általánosan elfogadott vélemény volt eddig, hogy a P2 promóterek gyenge, konstitutiv promóterek, amelyek - a körülményektől függetlenül - a riboszomális RNS-ek alapszintézisét biztosítják. Az újonnan felfedezett szabályozás ugyanakkor a P2 promóterre is hat, és drámai változásokat idéz elő a promóter aktivitásában.

Ezért a továbbiakban - a reguláció részletesebb megismerését célzó kísérletek során - elsősorban a P2 promóterre koncentráltunk. Legelőször arra voltunk kíváncsiak, hogy a maximumot követő gyors aktivitáscsökkenés valamiféle "kimerülés"

következménye-e, vagyis, hogy az aktivitásesés feltételezi-e az előzetes maximumot. Az alternativ magyarázat szerint a promóteraktivitás a sejt fiziológiás állapotától függ, amit egyéb faktorok befolyásolnak.

A kérdés eldöntésére a pER1 plazmiddal transzformált JM107 sejteket IPTG nélkül növesztettünk a késői logaritmikus fázisig (ahol a kontroll sejtkultúra alfa-peptid aktivitása már elérte a minimumot), majd a sejteket indukáltuk. Ebben az esetben az aktivitásmaximum elmaradt (6. ábra), ami egyértelműen a második lehetőség javára dönt.

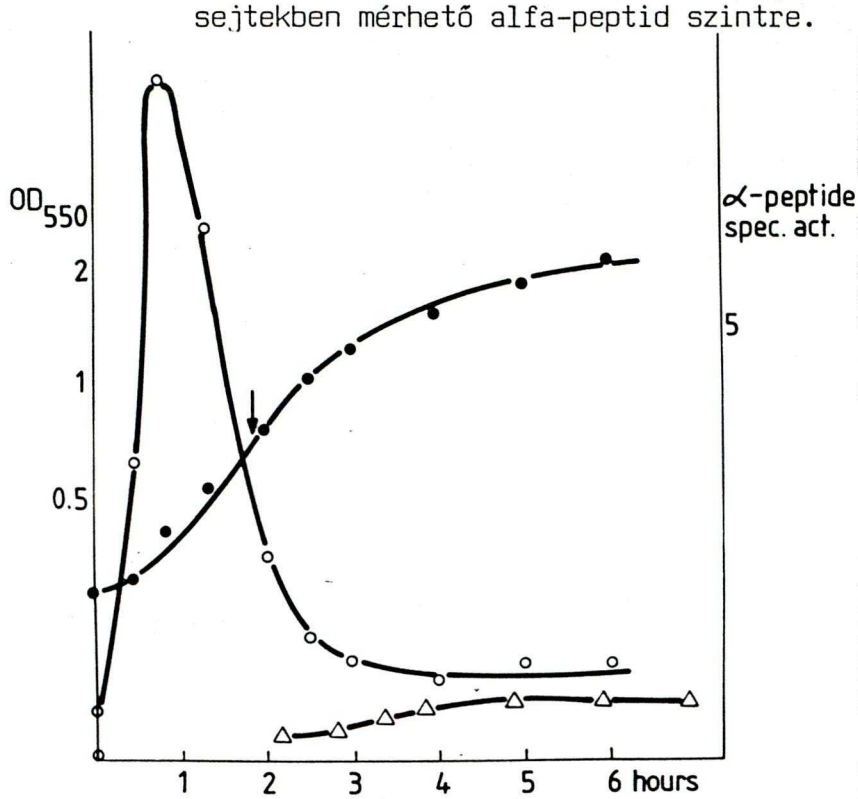
A továbbiakban azt kívántuk megtudni, hogy a környezet mely paramétereinek a változása hozható kapcsolatba a szabályozással. Az eddigi kísérletek során mindig éjszakán át növesztett (stacioner) sejtkultúrából vett indukulummal indítottuk az új tenyészetet, és a leoltást gazdag táptalajra (YTB) végeztük. Ez tulajdonképpen ún. metabolikus (nutritionális) shift-up-ot jelent a sejtek számára, ugyanis a tápanyagokban már nagymértékben elszegényedett környezetből hirtelen tápanyagdús környezetbe kerülnek.

Önmagát kínálta tehát a gondolat, hogy megvizsgáljuk a sejtek viselkedését a táplálkozási shift-up egyéb formái között. Ennek érdekében a pER1 plazmiddal transzformált sejteket M9 glükóz minimál táptalajon növesztettük IPTG jelenlétében, míg a sejtsűrűség az OD_{550}=0.6 értéket el nem érte (ez a közép logaritmikus fázisnak felel meg), majd a sejteket áthelyeztük IPTG-t szintén tartalmazó YTB táptalajra. A várakozásnak megfelelően hasonló alakú alfa-peptid aktivitásgörbét kaptunk, mint a "klasszikus esetben" (7. ábra).

Az ismertetett kísérletek alapján bizonysággal állíthatjuk, hogy az rrnB riboszomális RNS promótereknek egy eddig ismeretlen, új típusú szabályozását fedeztük fel, amely stacioner fázisból történő kinövesztés, vagy metabolikus shift-up során jelentkezik, és amelyet a továbbiakban shift-up regulációnak fogok nevezni.

6. ábra

A késői indukció hatása a pER1 plazmiddal transzformált JM107 sejtekben mérhető alfa-peptid szintre.



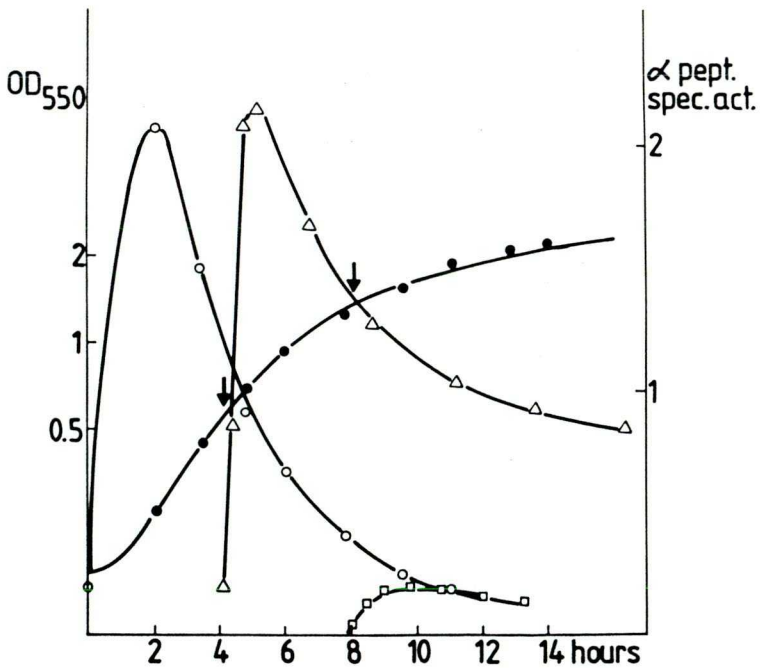
o : kezdettől fogva indukálva növesztett sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásának változása

▲ : későbbi időpontban indukált sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásának alakulása (a nyíl az indukció időpontját jelzi)

● : a sejtsürüség változása az idő függvényében

7. ábra

A minimál táptalajról gazdag táptalajra helyezés (shift-up) hatása az alfa-peptid specifikus aktivitásra



o : megegyezik a 6. ábra azonos jelölésével

● : megegyezik a 6. ábra azonos jelölésével

▲ : az alfa-peptid specifikus aktivitás változása a sejtekben, minimál táptalajról gazdag táptalajra történő helyezés után. (a sejtek (mindvégig indukált állapotban voltak. Az első nyíl az áthelyezés időpontját jelzi.Az ábra ugyancsak mutatja a késői indukció hatását is a □-el jelölt görbén

(Lukácsovich és mtsai 1987)

A szabályozás "anatómiájának" pontosabb megismerésére folytatott kutatások a továbbiakban kettéváltak. Egyfelöl az eddigi kísérletek nem nyújtottak semmilyen információt arra nézve, hogy a szabályozás milyen szignál és effektor molekulákon keresztül valósul meg. A kérdés megválaszolására több kísérletet terveztünk, ezek többségét munkatársaim végezték el. A kísérletek eredményeit és konklúzióját részben a jelen fejezet végén, részben a Diszkusszió címszó alatt érintem röviden. Másrészt - a DNS szerkezet felöl közelítve - a szabályozás célpontjának (targetjének) pontos lokalizálását kíséreltük meg. A P2 promóter vonatkozásában a targetet behatárolja egyrészt a pER23-as plazmid - amely a promóter -10-es boxát követően mindössze 2 bp-t tartalmaz, vagyis a deléció a teljes riboszomális leader szekvenciát eltávolította - valamint a pER1-es plazmid - amelyen megtalálható még további 33 bp-nyi eredeti rrnB szekvencia. A pER1-es klón mutatja a shift-up szabályozást, a pER23-as klón nem.

5.1.8. A pIl1 plazmid létrehozása

Kézenfekvő a gondolat, hogy ezt a 33 bp hosszúságú DNS szakaszt tovább rövidítsük, és megkíséreljünk választ kapni arra a kérdésre, hogy minimálisan hány bp-nyi leader szekvencia szükséges a szabályozás megvalósulásához. A pER-plazmidok előállítása során - az eredeti delécióSorozat tagjai között - nem sikerült olyan plazmidot találnunk, amely céljainknak megfelelt volna, vagyis amelynél a Bal31 exonukleáz valahol félúton állt volna meg a pER1-es, illetve pER23-as plazmidok delécIós végpontjai között. Egy szerencsés véletlen azonban a segítségünkre sietett. A pER23-as plazmid keletkezésekor a delécióképzés, majd az azt követő ligálás során az rrnB és a lac eredetű szekvenciák összekapcsolódásánál egy egyedi NsiI restrikciós hasítóhely (ATGCAT) generálódott (2. és 8. ábra).

8. ábra

A pIll plazmid promóter régiójának kialakítása

pER23

TATTATGCA----------TGGAATTGTGAGCGGATAACAAT

pER1

T/1 T/2

TATTATGCACACCCCGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT

Szintetikus oligonukleotid:

TCACCCCGCGCCGCTGATGCA

ACGTAGTGGGGCGCGGCGACT

pIll

T/1

TATTATGCATCACCCCGCGCCGCTGATGCA----------TGGAATTGTGAGCGGATAACAAT

A promóterek -10-es régióját aláhúzás jelzi, a transzkripciós iniciációs nukleotidokat félkövér betüszedés mutatja.
A szabályozás feltételezett target régiójának első (G/C gazdag) és második (A/T gazdag) részét T/1, T/2 -vel jelöltem.

(Itt említem meg, hogy ugyanakkor a lac operátor pontosan ugyanolyan távolságra került a P2 promótertől, mint amilyen távolságra az eredeti helyén, a lac operonban van a lac promótertől. Ennek a körülménynek a későbbiek során lesz jelentősége, az expressziós vektorok kifejlesztése során.) Az "ajándékba kapott" hasítóhelyet felhasználva tetszőleges szintetikus, kétszálú DNS darabot lehet a pER23 plazmidba beépíteni -a plazmid DNS NsiI restrikciós enzimmel történő hasítása után- amennyiben a szintetikus oligonukleotid NsiI ragadós végekkel rendelkezik.

Ha alaposabban megnézzük a pER1 plazmid érintett szakaszát (2. és 8. ábra), akkor azt látjuk, hogy a szóbanforgó 33 bp hosszúságú DNS szakasz jó közelítéssel egy proximális (a promóterhez közelebbi) G/C gazdag, és egy disztális (a promótertől távolabbi) A/T gazdag részre osztható. Munkahipotézisként feltételezve, hogy a két eltérő szerkezetű (bázisösszetételű) DNS szakasz funkcionálisan is különbözik egymástól, a 8. ábrán látható oligonukleotidot - amely a shift-up szabályozás feltételezett targetjének G/C gazdag részét tartalmazta és NsiI ragadós végekkel rendelkezett - beépítettük az NsiI enzimmel emésztett pER23 plazmidba. A plazmidon végzett dideoxi szekvencia meghatározással (Sanger és mtsai 1977) ellenőriztük az oligonukleotid orientációját. A jó orientációjú inszertet tartalmazó klón (pIl1), a pER-plazmid sorozat újabb tagját jelentette.

5.1.9. A pIl1 plazmid in vivo és in vitro promóteraktivitása

Előzetes várakozásainknak az felelt volna meg, ha a pIl1 plazmiddal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid aktivitásgörbéje valahol a pER1 és a pER23 plazmidok aktivitásgörbéi között helyezkedik el, egyikhez vagy másikhoz közelebb. Ezzel szemben - nem kis meglepetésünkre - a pIl1 plazmid gyakorlatilag inaktivnak bizonyult.

A klón alfa-peptid aktivitása - a komplementációs teszt körülményeit úgy választva meg, hogy a pER23 plazmiddal transzformált sejt aktivitása magasabb legyen, mint a reakció lineáris tartományának felső határa - még mindig kimutathatatlanul alacsony volt. A két klón aktivitásának a különbsége ennek alapján legalábbis megközelítette a 3 nagyságrendet.

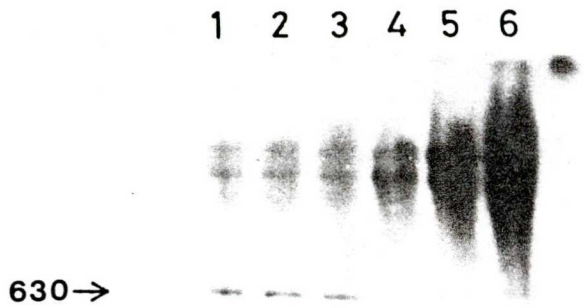
Az első kérdés természetesen megint az volt, hogy a pIll-es klón inaktivitása nem vezethető-e vissza transzlációs okokra. A két klónból ^{3}H-uridinnel végzett pulzusjelölés után össz-RNS-t preparáltunk, majd az RNS mintákat poliakrilamid gélelektroforézis után autoradiografáltuk. A kísérlet eredményét a 9. ábrán láthatjuk. Míg a pER23 plazmid specifikus mRNS rendkívül abundáns, addig a pIll plazmid specifikus transzkriptum - a sokkal nagyobb össz radioaktivitás ellenére - alig kivehető. Vagyis a pIll plazmid esetében ténylegesen a promóteraktivitás gátlásáról van szó, a leader szekvencia G/C gazdag első 15 nukleotidja által.

A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy ugyanez a különbség fennáll-e a két plazmid promóteraktivitása között, in vitro rendszerben is, ezért tisztított E. coli RNS polimerázzal in vitro transzkripiós kísérletet végeztünk. A 10. ábrán jól látható, hogy ilyen körülmények között a két promóter aktivitása gyakorlatilag egyforma.

Az in vivo és in vitro eredmények közötti ellentmondás feloldásához fel kell tételeznünk, hogy a sejtben - az RNS polimerázon kívül további, feltehetőleg fehérje természetű - faktor, vagy faktorok vannak jelen, amelyek az in vitro rendszerből hiányoznak, és amelyek a pIll plazmidon lévő promóter inaktiválásáért felelősek. Csiszár Katalin gél retardációs kísérletekben igyekezett kimutatni specifikus fehérjék jelenlétét, amelyek a pIll, illetve a hosszabb riboszomális leadert tartalmazó más pER-plazmidok (pl. pER1 plazmid)

9. ábra

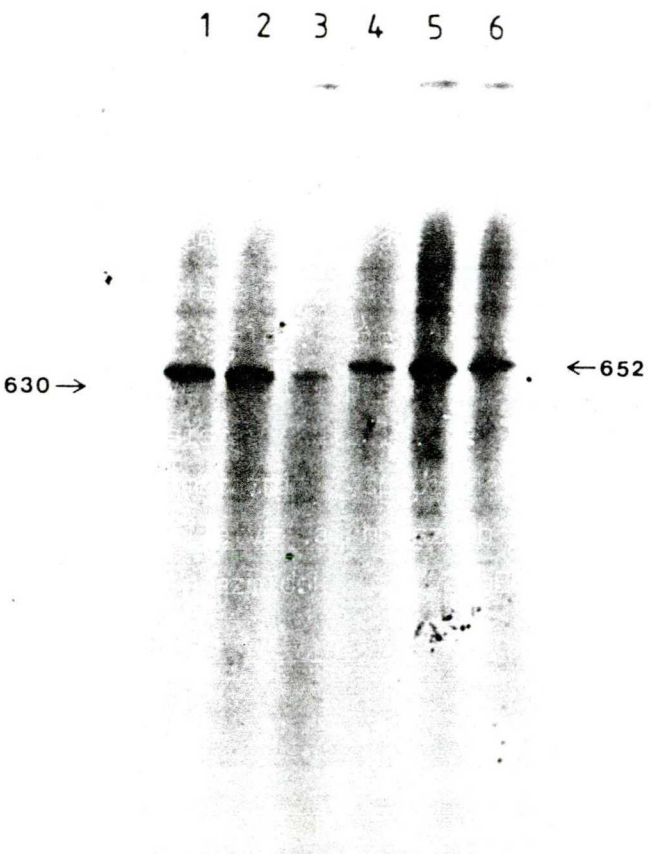
In vivo transzkripció



Az autoradiogrammon a pER23, illetve pIll plazmiddal transzformált JM 107 sejtek rádióaktiv pulzusjelölése után preparált össz-RNS elektroforetikus képe látható. (4%-os PAA gél, 7M urea.)
Minták 1 - 3-ig: A pER23 plazmiddal transzformált sejtek össz-RNS-ének 5 ; 10 és 15 ul-es mennyisége
Minták 4 - 6-ig: A pIll plazmiddal transzformált sejtek össz-RNS-ének 5 ; 10 és 15 ul-es mennyisége
A nyíl a pER23 plazmid specifikus transzkriptumot jelöli.

10. ábra

In vitro transzkripció



A kisérletet 50mM alfa-^{32}P ATP és 2 ug supercoiled plazmid templát felhasználásával folytattuk.
Minták 1 - 3-ig : pER23 plazmid DNS-el végzett 3 párhuzamos kisérlet.
Minták 4 - 6-ig : pIll plazmid DNS-el végzett 3 párhuzamos kisérlet.
A nyilak a specifikus transzkriptumokat jelölik

feltételezett target régiójához kötődnek. Az eredmények nem voltak mentesek minden ellentmondástól, de erősen valószínűsítették a vizsgált DNS szakaszhoz specifikusan kötődő fehérjék létezését. A szóbanforgó fehérjék feltehetőleg a shift-up reguláció (a pER1-es plazmid esetében), illetve a promóter inaktiválás (a pIl1-es plazmid esetében) effektorai (Csiszár és mtsai 1990).

Valószínűnek látszik, hogy a pER1 plazmidon megfigyelt shift-up szabályozás és a pIl1 plazmid promóterének represszió ja egymástól nem élesen elválasztható jelenségek, hanem egy komplex szabályozás két különböző megnyilvánulási formája, az eltérő kísérleti alanyok következtében. A szabályozásnak egy lehetséges modelljét a Diszkusszió fejezetben tárgyalom.

Természetesen az eddig részletezett kísérletek semmilyen támpontot nem nyújtottak a shift-up szabályozás pontos mechanizmusát illetően, vagyis hogy milyen sejtreceptorok érzékelik a "tápanyagkoncentráció" változását (és melyik táplálékkomponens vagy komponensek a tényleges induktorok), valamint hogy milyen szignál molekulák közvetítik az információt a szabályozásban résztvevő regulátor fehérjék felé.

5.1.10. ppGpp szabályozás?

Az utóbbi kérdést illetően rögtön adódott egy gyanusított a ppGpp "személyében", amely molekuláról -az irodalmi áttekintésben említetteknek megfelelően- közismert, hogy sokoldalúan résztvesz a stabil RNS-ek szintézisének szabályozásában, a promóteraktivitás gátlásán keresztül. A ppGpp szintnek a riboszomális P2 promóterekre gyakorolt hatását illetően az irodalmi adatok ellentmondásosak, mégis többségükben megegyeznek abban, hogy a ppGpp csak a P1 promóterek aktivitásának a szabályozásában vesz részt. Úgy gondoltuk azonban, hogy -tekintettel arra, hogy az irodalmi adatok abban is megegyeznek, hogy az rrnB P2 promóter gyenge konstitutiv

promóter, ugyanakkor a pER23 plazmid "regulálatlan" P2 promótere adekvát rendszerben összehasonlítva a legerősebb coli promóterek között számontartott Tac promóterrel, annál erősebbnek bizonyult (lásd az 5.2.3. fejezetet)-, az ellentmondás feloldására kínálkozik egy egyszerű magyarázat. A közép logaritmikus növekedési fázisban - ahol a tetrafoszfát szint és promóteraktivitás összefüggésére vonatkozó kísérletek túlnyomó részét végezték - a P2 promóter aktivitása már a shift-up szabályozás leszálló ágában van, vagyis a kutatók egy már represszált aktivitás további gátlását próbálták meg elérni a tetrafoszfáttal. Hogy ez nem sikerült, az nem bizonyítja egyben, hogy a korai logaritmikus fázisban mutatkozó aktivitásmaximum nem a lecsökkent ppGpp szint következménye-e. Méginkább megalapozottá tette ezt a feltételezést az a tény, hogy a JM107 törzs - amelyben kísérleteink többségét végeztük - relA genotípust hordoz, vagyis eleve alacsonyabb tetrafoszfát szint található benne.

A kérdés eldöntésére a következő -itt csak nagy vonalakban vázolt- kísérletet terveztük:

Két párhuzamosan növesztett, pER1 plazmiddal transzformált JM107 sejtkultura egyikéhez a korai logaritmikus növekedési fázisban szerinhidroxamátot, a másikhoz kloramfenikolt adtunk. Mindkét esetben a fehérjeszintézis gátlása és ezáltal a sejtek növekedési sebességének a csökkenése következik be, azonban míg a szerinhidroxamát - a stringens válasz indukciója következtében - emeli, addig a kloramfenikol csökkenti a sejten belüli ppGpp szintet. Természetesen a szintézisgátlókat olyan koncentrációban használtuk, hogy a sejtnövekedés lassulása mindkét esetben azonos legyen. Azt vártuk, hogy rövid idő elteltével a kloramfenikol fokozni, a szerinhidroxamát viszont csökkenteni fogja a P2 promóter aktivitását és így az alfa-peptid aktivitásértékeket is. Ezzel szemben mindkét esetben az aktivitás lassú, párhuzamos csökkenése kövekezett be, tehát a ppGpp mentesült a gyanú alól.

Nagyon röviden és ugyancsak a kísérletek részletes megtárgyalása nélkül szeretnék kitérni egy további körülményre. Természetesen foglalkoztatott minket a gondolat, hogy a shift-up reguláció mennyire általános, illetve mennyire korlátozódik a JM107 törzsre, illetve az rrnB operonra. Ezért hasonló kísérleteket végeztünk JM101 törzzsel (amely többek között nem relA genotípusú), valamint - részleteiben kicsit módosított kísérleti rendszerben - ED8800 törzzsel. A shift-up reguláció mindkét esetben "működött".

Ugyancsak mutatott shift-up regulációt az a plazmid, amely egy pER plazmidból olymódon származott, hogy az rrnB P2 promótert a szabályozó szekvenciáival együtt az rrnD P2 promóter azonos régiójával cseréltük ki. Meglehetős biztonsággal állítható tehát, hogy a shift-up szabályozás általánosan jellemző az E. coli baktérium riboszomális RNS operonjaira.

5.2.1. Promótererősség

A 2.5.3. fejezetben vázoltak alapján általánosan elfogadott feltételezés, hogy egy promóter erőssége jól korrelál az "ideális" (consensus) szekvenciához való hasonlóságának a mértékével (Hawley és McClure 1983, Mulligan és mtsai 1984, Harley és Reynolds 1987, Szőke és mtsai 1987). Ismeretesek azonban olyan megfigyelések, amelyek némiképp ellentmondanak ennek az egyszerűségében igen tetszetős elméletnek.
Néhány példa ezek közül:
1. Egy szintetikus consensus promóter - alkalmas tesztrendszerben összehasonlítva számos természetes E. coli promóterrel - meglepően gyengének bizonyult (Rossi és mtsai 1983).
2. Különböző laboratóriumokban végzett kísérletekből levont egybehangzó következtetések szerint a promóter erősségének a meghatározásában a konzervatív hexanukleotid boxokon kívül eső - azoktól upstream vagy downstream elhelyezkedő - DNS szakaszok is szerepet játszanak (Deuschle és mtsai 1986, Kammerer és mtsai

1986, Brunner és Bujard 1987, Gaál és mtsai 1989).
3. A riboszomális RNS promóterek szekvenciája több ponton eltér a consensustól (és ezzel összhangban különböző in vitro kísérleti rendszerekben mutatott aktivitásuk nem kiemelkedő) (Kajitani és Ishihama 1983), ugyanakkor - mint már a bevezetőben említettem - ezek a promóterek valószínűleg a legerősebb in vivo E. coli promóterek, hiszen az exponenciális növekedési fázisban a sejt össz RNS szintézisének a nagyobbik hányada ezeken a promótereken folyik.

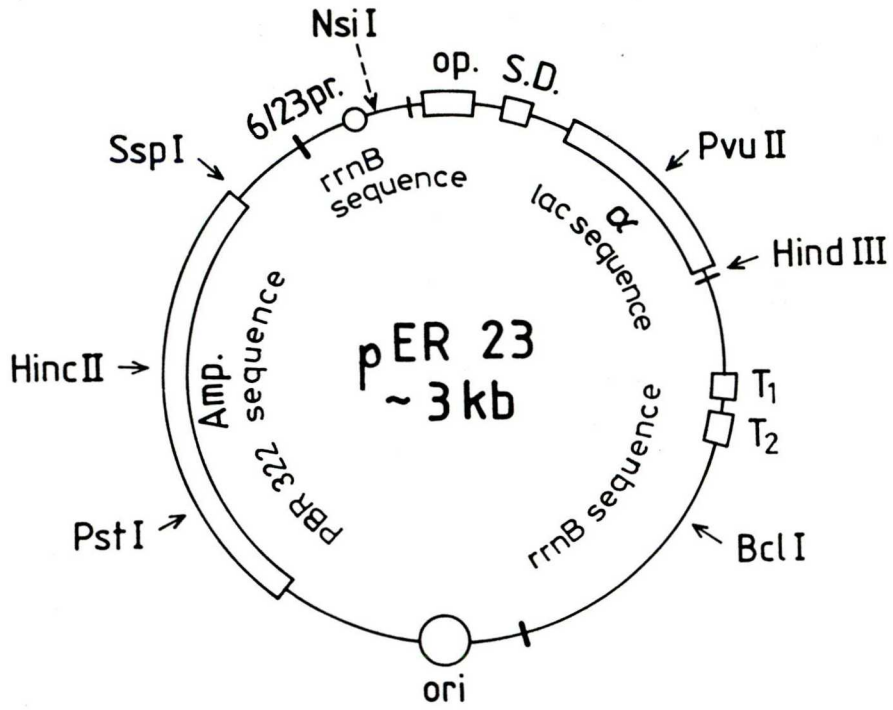
Úgy tűnik tehát, hogy az említett leegyszerűsített kép - legalábbis in vivo körülmények között - nem tükrözi teljes mértékben a valóságot. Úgy gondoltuk, hogy közelebb kerülhetünk a probléma megoldásához, ha a pER23 plazmid rrnB P2 promóterét - amelyet az előző fejezetben leírtak szerint megfosztottunk a downstream szabályozó szekvenciától - részletes vizsgálatnak vetjük alá. A promótert a továbbiakban 6/23-as promóternek fogom nevezni (12/a ábra), a tesztplazmid sematikus rajza a 11. ábrán látható.

Munkánk kezdetekor az alábbi kérdések megválaszolását kísérletük meg:
1. Az rrnB P2 promóter (jelen esetben annak módosított változata, a 6/23-as promóter) valóban erősebb-e in vivo egy consensus promóternél, például az igen erős E. coli promóterként számontartott hibrid tac promóternél (DeBoer és mtsai 1983)? Természetesen az ilyen összehasonlításnak adekvát körülmények között kell történnie. Ez úgy valósítható meg, ha a tac promótert ugyanolyan környezetbe helyezzük, mint amilyenben a 6/23-as promóter van. Vagyis a pER plazmidokéval megegyező szerkezetű plazmidot kell konstruálnunk, ahol a tac promóter nukleotidra teljesen azonos mRNS szintézisét vezérli, mint a 6/23-as promóter a pER23 plazmid esetében.

Amennyiben az első kérdésre igenlő választ kapunk, akkor két alternatív magyarázat képzelhető el. A 6/23-as promóter vagy éppen a consensustól eltérő szekvenciájának köszönheti rendkívüli

11. ábra

A pER23 vektorplazmid sematikus rajza



Jelölések:

op	:	lac operátor
S.D.	:	Shine-dalgarno szekvencia (riboszómakötőhely)
ori	:	replikációs origó

12. ábra

A 6/23 promóter származékainak és a pKKalfa3 plazmid Ptac promóterének, valamint a promótereket követő leader régióknak a DNS nukleotid sorrendje

a.) pER23 (6/23 pr.)
TTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTATGCATGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGA

b.) pER23(-Nsi) (6/23-Nsi pr.)
TTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTATGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGA

c.) pKKalfa3 (tac pr.)
TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGA

d.) pER23P2cons (P2cons. pr.)
TTGACACTGTAGCGGGAAGGCGTATAATGCATGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGA

A promóterek -35-ös és -10-es régióit, valamint a lac operátor szekvenciát aláhúzás jelöli.

erősségét, vagy a konzervatív hexanukleotid boxokon kívüleső régiók is nagymértékben felelősek a promóteraktivitás meghatározásában.
Vagyis
2. lehet-e tovább növelni a 6/23-as promóter erősségét azáltal, hogy a konzervatív boxok szekvenciáját a consensusával megegyezőre változtatjuk?
Illetve
3. milyen hatást gyakorolnak a promóter aktivitására a hexanukleotid boxokon kívüli régiókban bekövetkező változások?

5.2.2. A pKKalfa3 plazmid létrehozása

A tac promóternek a 6/23-as promóterével azonos kontextusba helyezését megkönnítette, hogy rendelkezésünkre állt a pKK223-3 elnevezésű expressziós vektor plazmid (Brosius és Holy 1984), amely a tac promótert és a lac eredetű szabályozó régiót (12/c ábra) követően egy polilinker szekvenciát tartalmaz. A polilinker EcoRI hasítóhellyel kezdődik és HindIII hellyel végződik.

A plazmidot EcoRI-el hasítottuk, a 4 nukleotid hosszúságú egyszálú, túlnyúló véget S1 nukleáz enzimmel leemésztettük, majd HindIII emésztést végeztünk. Az így kapott - tompa véggel, illetve HindIII ragadós véggel rendelkező - vektor fragmentumot összeépítettük a pER23 plazmidból származó 188 bp hosszúságú AluI, HindIII fragmentummal, amely a teljes alfa-peptid gént tartalmazta a transzlációs startkodont közvetlenül megelőző AluI helytől a gént szintén közvetlenül követő HindIII helyig. Az így keletkezett plazmid (pKKalfa2) a transzkripciós startponttól számított -4-es poziciótól kezdődően az alfa-peptid gén teljes hosszán keresztül nukleotidra megegyezik a pER23-as plazmid hasonló régiójával. Vagyis a két promóter által szintetizált mRNS az 5' nem átíródó részt, valamint a kódoló szakaszt illetően már teljesen azonos. Ugyanakkor a 3' nem átíródó rész szekvenciája még különbözik és az átírás iránya is ellentétes a két plazmidon

(ez utóbbi körülménynek azért van jelentősége, mert a plazmid replikációja interferálhat a vele ellentétes irányú transzkripcióval). Ezért a következő lépésben a pKKalfa2 plazmid 385 bp hosszúságú BamHI, PvuII fragmentjét -amely 5'-3' irányban tartalmazta a tac promótert egy 200 bp hosszúságú upstream DNS szakasszal együtt, a lac operátort és riboszómakötőhelyet, valamint az alfa-peptid gén első felét-, beépítettük egy pER plazmid származék (pER23 E,H) BamHI, PvuII helyére. (A pER23 E,H plazmidot a pER23 plazmidból készítettük több lépésben - itt részleteiben nem ismertetett módon - melynek végeredményeképpen a 6/23 promóter UAS-ja kicserélődött a PivX plazmid polilinker régiójára (Lukácsovich és mtsai 1989).

Az így kapott - pKKalfa3 elnevezéssel jelölt - plazmidról, valamint a pER23-as plazmidról pontosan ugyanaz a transzkripciós és transzlációs termék (mRNS és alfa-peptid) szintetizálódik, a két plazmid csak promóterrégiójában különbözik. A pKKalfa3 plazmid létrehozásának lépéseit a 13. ábra mutatja.

5.2.3. A 6/23 illetve tac promóterek aktivitásának összehasonlítása a pER23, illetve pKKalfa3 plazmiddal transzformált sejtekben.

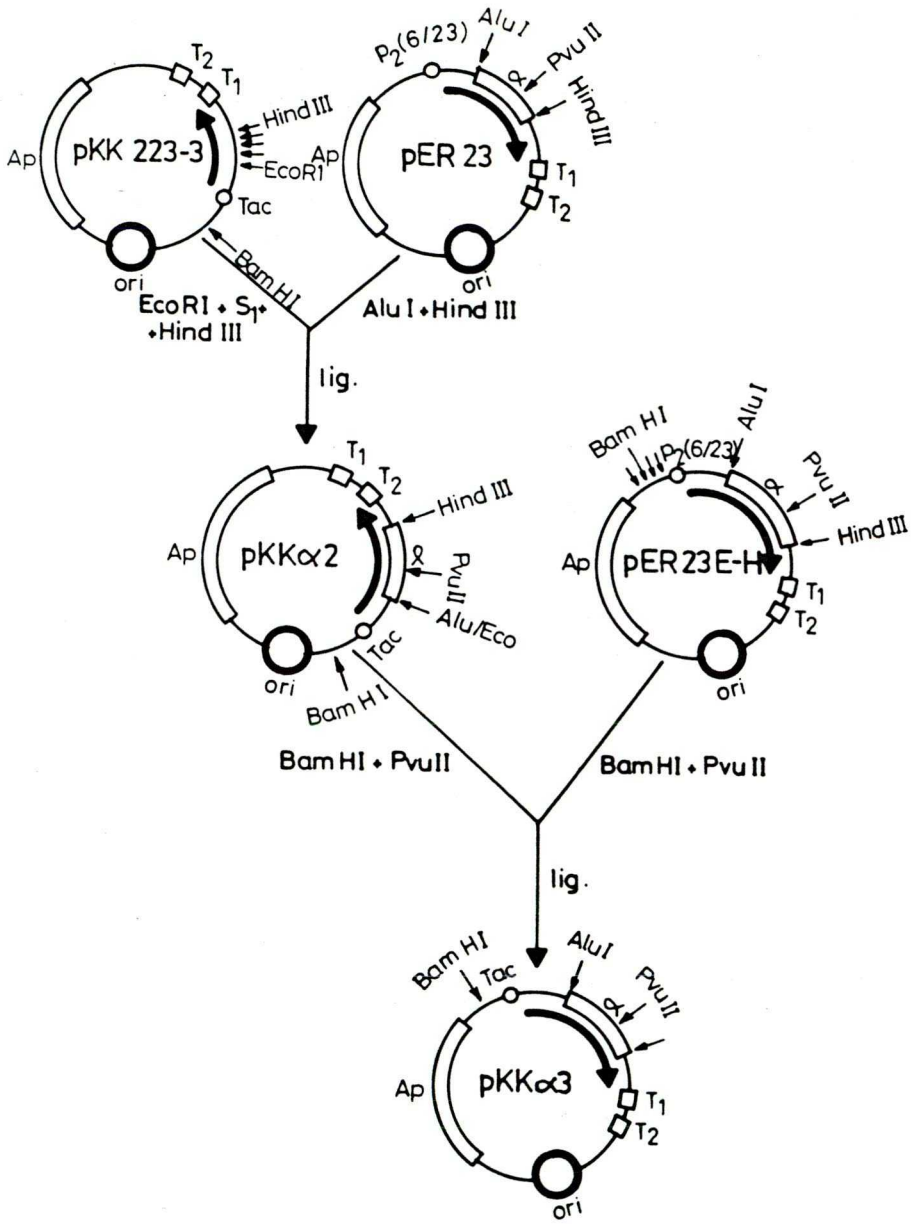
Az összehasonlítást transzkripciós és transzlációs szinten egyaránt elvégeztük. A specifikus mRNS szintézisrátájában mutatkozó különbség a 14. ábrán látható, az alfa-peptid aktivitásgörbéket a 15. ábra mutatja. "A fair play szabályai szerint történő összehasonlításból láthatóan a 6/23-as promóter került ki győztesen."

5.2.4. A 6/23-as promóter konzervatív boxainak "consensussá" alakítása

Áttérve a 2-es számmal jelölt kérdésre, az oligonukleotid vezérelte mutagenezis módszerével (Zoller és Smith 1984) a 6/23

13. ábra

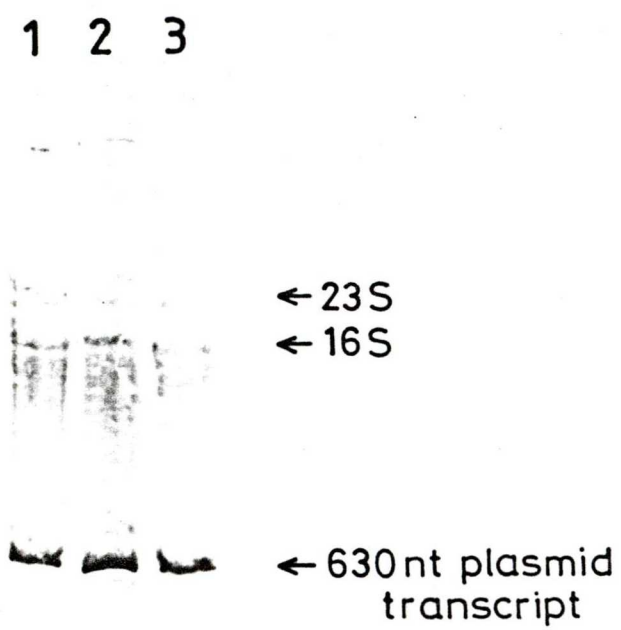
A pKKalfa3 plazmid keletkezéséhez vezető lépések



A vastag nyilak az egyes plazmidok replikációjának irányát jelzik

14. ábra

A pER23, pER23(-Nsi) és pKKalfa3 plazmidok promóteraktivitásainak összehasonlítása



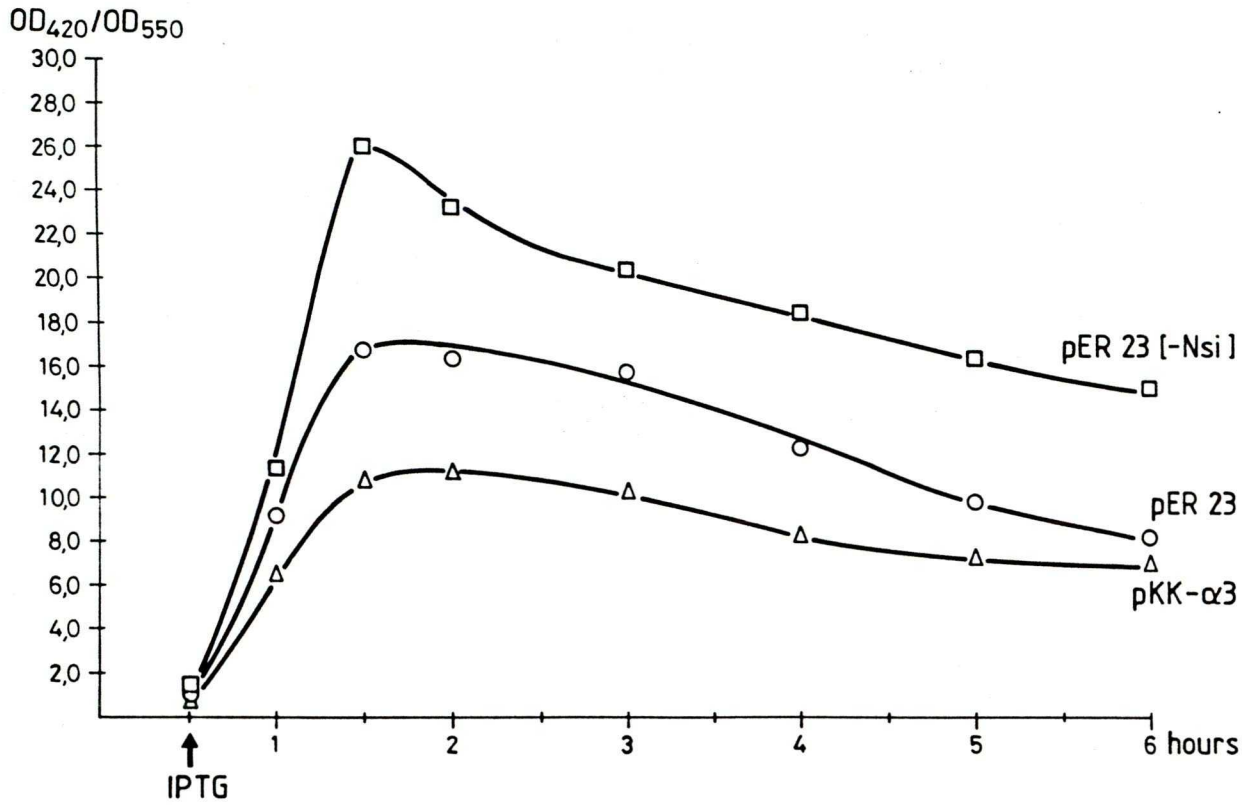
A sejtkultúrákat ml-enként 40 MBq ^{3}H uridinnel (specifikus aktivitás = 742 GBq/mmol) jelöltük 30 másodpercen keresztül. Az RNS mintákat 4%-os PAA-ureás gélen futtattuk.

Minták:
1. pER23 plazmiddal transzformált JM107 sejttenyészetből preparált össz-RNS
2. pER23(-Nsi) plazmiddal transzformált JM107 sejttenyészetből preparált össz-RNS
3. pKKalfa3 plazmiddal transzformált JM107 sejttenyészetből preparált össz-RNS

A nyilak a 23S és 16S rRNS-t, valamint az összehasonlítandó promóteraktivitásokra jellemző - 630 nukleotid hosszúságú - transzkriptumot jelölik.

15. ábra

A pER23, pER23(-Nsi) és pKKalfa3 plazmidokkal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásainak összehasonlítása.



(Az alfa-peptid kinetikai görbék felvételének körülményei minden tekintetben megegyeztek a korábbi kisérletekével.)

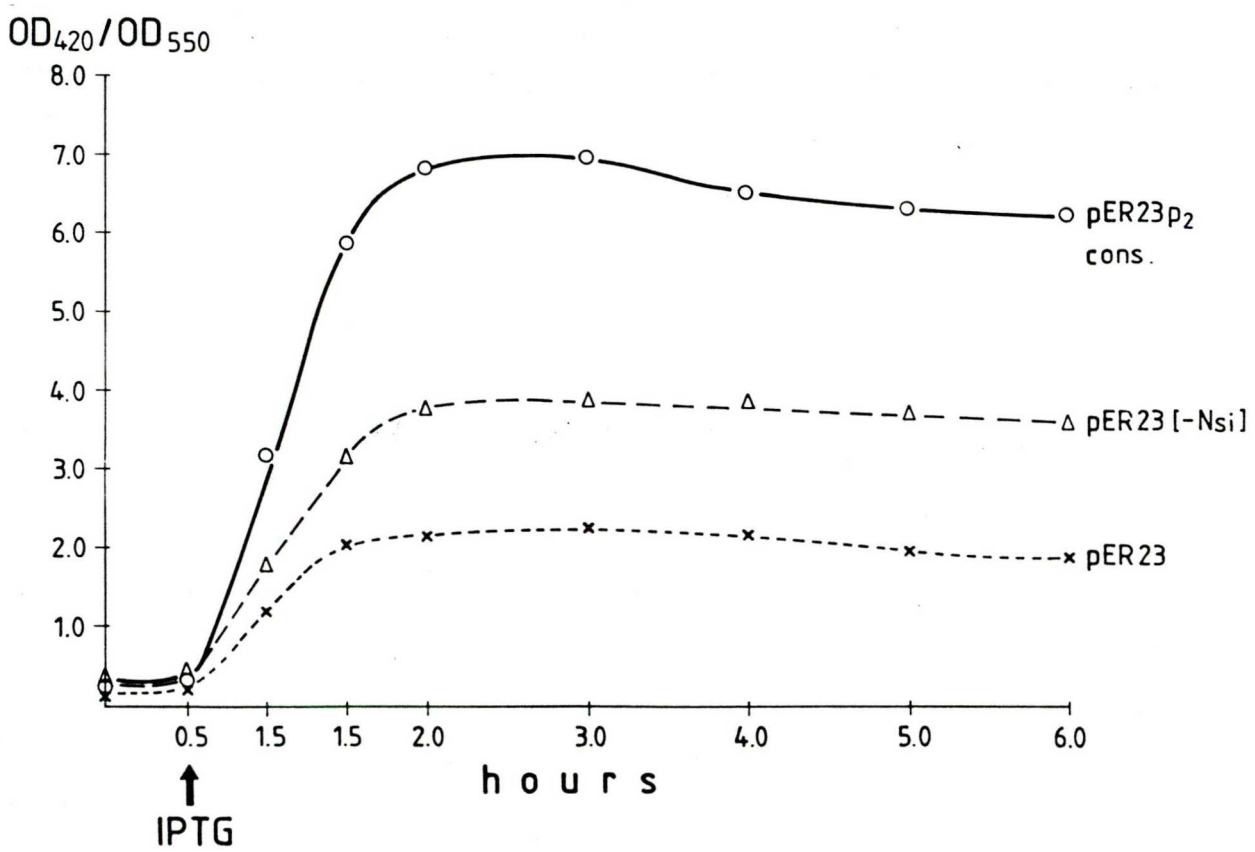
promóter szekvenciáját két ponton megváltoztattuk. A pontmutációk mindkét konzervatív boxban a consensuséval megegyezőre cserélték az eltérő nukleotidokat (12/d ábra). A 16. ábrán látható alfa-peptid aktivitásgörbék alapján bizonyossággal állíthatjuk, hogy a nukleotid cserék rendkívüli mértékben - több mint 3-szorosára emelték az amúgyis igen erős promóter aktivitását.

5.2.5. További átalakítások

Az eddigi kísérletekből nagy valószínűséggel következett, hogy a 6/23-as promóter kiemelkedő aktivitásának a magyarázata a konzervatív hexanukleotid boxokon kívüleső területeken keresendő. Ezért először a promótertől downstream elhelyezkedő DNS szakaszon hajtottunk végre egy kisebb átalakítást. Itt az rrnB eredetű DNS szekvencia mindössze néhány nukleotidra korlátozódik és ezen belül - az 5.1.10. fejezetben leírtaknak megfelelően - egy egyedi NsI restrikciós hasítóhely található. Ennek figyelembevételével igen könnyen ki lehetett ejteni 4 bp-t a transzkripciós startpont és a promóter -10-es régiója között. A pER23 plazmidot NsiI enzizmmel hasítottuk, a ragadós végeket alkotó belső 4 nukleotidot T4 polimeráz enzimmel leemésztettük, majd a plazmidot T4 DNS ligázzal újból gyűrűvé zártuk (12/b ábra). Meglepetésünkre a deléciós mutáns plazmidal (pER23-Nsi) transzformált sejt magasabb alfa-peptid mRNS szintet és enzimaktivitást mutatott a pER23 alapplazmiddal transzformált sejthez képest (14. illetve 15. ábra). Így kizárásos alapon a promótertől upstream elhelyezkedő DNS szakaszra terelődött a gyanú. Az rrnB P2 promótert illetően azonban mindeddig nem volt ismeretes UAS létezése. A promótertől upstream található - 80 bp hosszúságú - rrnB eredetű DNS szakasz eltávolítása technikailag nem látszott túl egyszerűnek. Az egyetlen alkalmas restrikciós hasítóhely egy HinfI hely (GANTC) volt a promóter - 35-ös régiójában. A 17. ábrán látható, hogy HinfI hasítás, a 3 nukleotid hosszúságú, túlnyúló, "ragadós" vég feltöltése Klenow polimeráz enzimmel,

16. ábra

A pER23, pER23(-Nsi) és pER23 cons. plazmidokkal transzformált JM107 sejtek alfa-peptid specifikus aktivitásainak összehasonlítása.



(Az alfa-peptid kinetikai görbék felvételének körülményei minden tekintetben megegyeztek a korábbi kisérletekével.)

17. ábra

DNS szekvencia változtatások az rrnB P2 (6/23) promótertől upstream elhelyezkedő régióban

a.) pER23 (6/23 pr.)
CGGCAGAGAAAGCAAAAATAAATGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTAT

b.) pER23-35H32
GCAAAAATAAATGCTTGACTCAAGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTAT

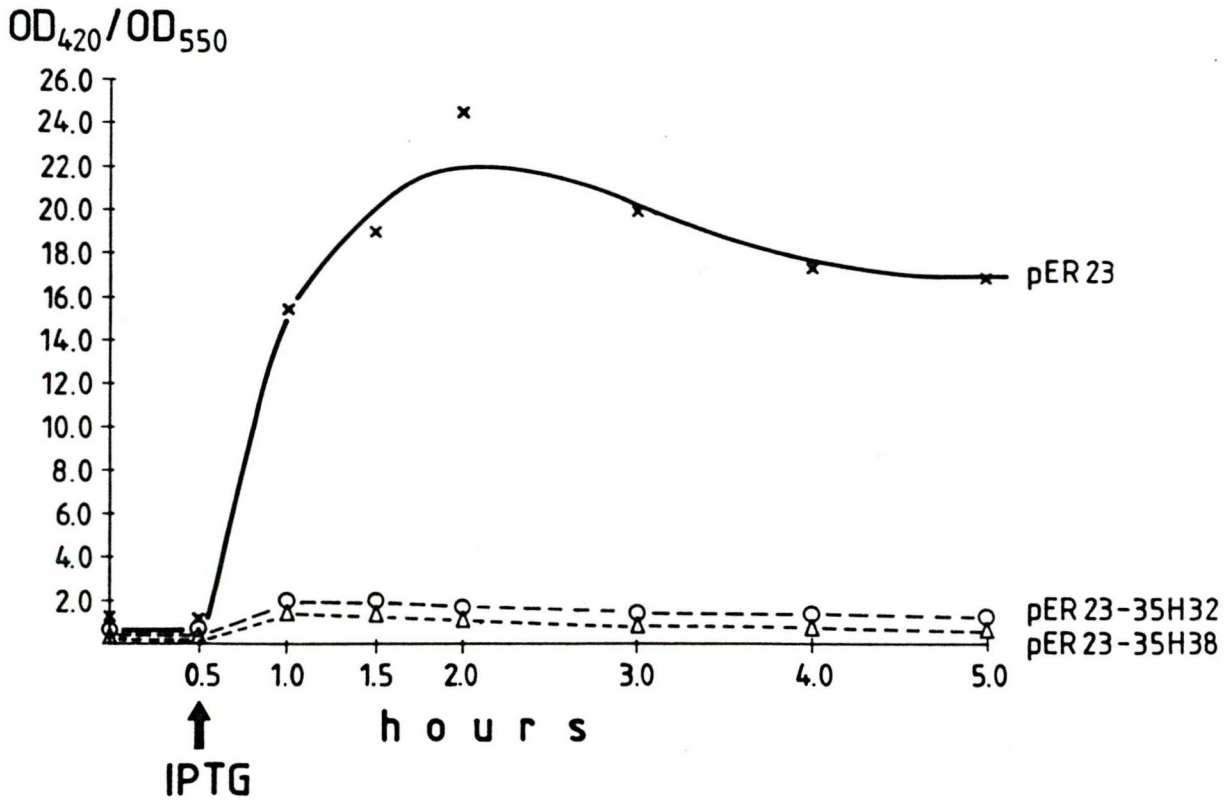
c.) pER23-35H38
GCCACTCGTCAGCAAAGAAGCAAGCTTGACTCTGTAGCGGGAAGGCGTATTAT

A promóter -10-es és -35-ös régióját aláhúzás jelzi.

majd egy szintetikus HindIII linker beépítése esetén a promóter -35-ös régiója és az azt megelőző 2 nukleotid változatlan marad (vagy helyesebben az eredeti szekvencia helyreáll), az attól upstream DNS szakasz viszont 11 bp-ral "balra" tolódik (17/b ábra). A pER23 plazmid azonban 7 további HinfI helyet tartalmaz, így - HinfI részleges emésztést és a linearizált forma izolálását, majd a feltöltést és a HindIII linker ligálását követően - meglehetősen sok klónt kellett átvizsgálnunk, míg olyanra találtunk, amelyben a linker a kívánt helyre épült be (pER23-35H32). A 18. ábrán látható, hogy az upstream DNS szakasz "odébb" helyezése drasztikusan csökkenti a promóter aktivitását. Ehhez képest a teljes A/T gazdag upstream régió eltávolítása és egy "indifferens" DNS szakasszal (a 16S rRNS strukturgén egy szakaszával) való helyettesítése (pER23-35H38 plazmid) már csak kismértékű, további aktivitáscsökkentést okozott. Vagyis nemcsak azt sikerült bizonyítanunk, hogy az rrnB P2 promótertől upstream található DNS szakasz valóban UAS-ként funkcionál, hanem azt is kimutattuk, hogy az UAS enhancer hatásának kifejtése erősen poziciófüggő és ez a pozíciófüggés érdekes módon nem mutatja a P1 promóter UAS hasonló távolságfüggésének említett 11 bp-os periodicitását sem (2.3. fejezet). (Ugyanakkor egyelőre nem ismerjük az adott DNS szakaszon belül az UAS pontos lokalizációját.)

18. ábra

Az UAS eltávolításának hatása a promóteraktivitásra
(az alfa-peptid specifikus aktivitáséértékek alakulása a pER23, pER23-35H32 és pER23-35H38 plazmidokkal transzformált JM107 sejtekben a növekedés során.)



(Az alfa-peptid kinetikai görbék felvételének körülményei minden tekintetben megegyeztek a korábbi kisérletekével.)

5.3.1. Expressziós vektorok

Ha egy promotert alkalmassá akarunk tenni expressziós vektor kifejlesztésére, akkor először a saját (intrinsic) szabályozását kell felfüggesztenünk -konstitutivvá kell alakítanunk-, hogy a sejt fiziológiás állapotától függetlenül, állandóan maximális intenzitással működjön, majd ezt követően egy akaratunktól függő, külső kontrol alá kell helyeznünk, vagyis tetszés szerint ki-bekapcsolhatóvá kell tennünk. Az előző fejezetben tárgyalt 6/23-as promoter és származékai mindkét követelménynek megfelelnek. A downstream regulátor régió eltávolítása következtében a promoterek állandóan aktivitásuk lehetséges maximumán dolgoznak (A 6.2. fejezetben tárgyalom, hogy a 6/23 cons. promoter aktivitását feltehetőleg csak a ribonukleotid szubsztrátok diffúziója limitálja). Ugyanakkor a promotert követően elhelyezkedő lac operátor szekvencia a promotert indukálhatóvá, vagyis egy külső kontrol számára hozzáférhetővé teszi. Így természetszerűleg adódik a gondolat, hogy a 6/23 promoterre alapozva kifejlesszünk egy sokoldalúan felhasználható expressziós vektorrendszert.

5.3.2. Az expressziós vektorok jellemzői

A vektorcsalád alapkonstrukciójának magát a pER23 plazmidot (11. ábra) tekinthetjük, hiszen az expressziós vektorokkal szemben támasztott valamennyi követelménynek maradéktalanul megfelel:

1.) Az expressziós vektorplazmid kell hogy rendelkezzen az idegen gén kifejezésére alkalmas transzkripciós és transzlációs szabályozó szignálokkal.

A pER23-as plazmid tartalmazza:

a.) az igen erős és indukálható 6/23 -as promotert, amely az rrnB P2 promoter és a lac operátor szekvencia összekapcsolódásával

jött létre.

b.) az erős, rho independens rrnB T1 és T2 tandem transzkripciós terminátorokat.

c.) a consensus lac riboszómakötőhelyet.

2.) A vektorplazmid pBR322 (Col E1) típusú replikácós origót hordoz, amely sejtenként 25-30 plazmidkópiát eredményez.

3.) Az ampicillin rezisztencia gén lehetővé teszi a plazmid fenntartását tetszőleges gazdatörzsben.

4.) Az idegen gén klónozása két egyedi restrikciós hasítóhelyre történhet, az alfa-peptid génjének belsejében lévő PvuII, valamint a gént követően található HindIII helyre. Mindkét esetben a géntermék ún. fúziós fehérje formájában keletkezik, ahol a fehérje N-terminálisát az alfa-peptid, a C-terminálisát pedig a túltermeltetni kívánt fehérje alkotja. (Természetesen a két gén összekapcsolását úgy kell megvalósítani, hogy az idegen gén az alfa-peptid génjével azonos leolvasási fázisban (reading frame-ben) legyen.)

A klónozást lehetővé tevő két egyedi restrikciós hasítóhely sok esetben elégtelennek bizonyulhat, ezért a következő lépésben a pER23 plazmid HindIII helyére klónoztuk a PiVX miniplazmid (Seed 1983) HindIII-HindIII polilinker fragmentumát (a szekvencia a 19. ábrán látható), mindkét orientációban. Az eredményül kapott pER234 és pER235 plazmidok esetében az idegen gének klónozására további restrikciós hasítóhelyek állnak rendelkezésre (ClaI, EcoRI, BamHI, PstI, BglII és XbaI).

5.3.3. Fúziós vektorok

Jól ismert jelenség, hogy számos eukarióta protein rendkívül instabil E. coliban, féléletidejük csak percekben mérhető. Sok esetben megoldás ezeknek a fehérjéknek fúziós peptid formájában történő termeltetése, ahol a bakteriális N-terminális partner mintegy megvédi a fehérjét a sejten belüli degradációval szemben. A 66 aminosavból álló alfa-peptidhez hasonló rövid bakteriális

fehérjék azonban sok esetben nem nyújtanak elegendő védelmet. Ezért két további vektor plazmidot konstruáltunk (pM23 és pL23), ahol a polilinker szekvenciát 279 aminosav hosszúságú (a pM23 plazmid esetében), illetve 409 aminosav hosszúságú (a pL23 plazmid esetében) N-terminális bakteriális fehérjét kódoló régió előzi meg. A pM23 plazmid esetében mind a 279 aminosav a béta-galaktozidáz enzimből (lacZ gén) származik, a pL23 N-terminálisát egy béta-galaktozidáz, kloramfenikol-acetil-transzferáz (CAT gén) fúzió alkotja, ahol a béta-galaktozidáz 375 aminosav hosszúságú N-terminális darabja van - gén szinten - összekapcsolva a CAT 39. és 72. aminosav közötti szegmentjével. A fúziós vektorok polilinker régiójában -különböző hasítóhelyekre- mindhárom leolvasási fázisban klónozhatók idegen gének.

5.3.4. "Direkt" klónozó vektorok

Sok esetben az idegen fehérjét bármiféle fúziós partnertől függetlenül, önmagában kívánjuk termeltetni. Ez tulajdonképpen az eddig ismertetett vektoraink valamelyikével is megvalósítható. A klónozott gén ekkor saját, bakteriális riboszómakötőhellyel kell hogy rendelkezzen, és a konstrukciót úgy kell megtervezni, hogy az idegen gén és a vektoron lévő gén (a lac Z gén 5' része, illetve a lacZ-CAT fúzió) egy mesterséges, két génes operont képezzen. Az expresszió akkor optimális, ha a kétcisztronos m-RNS első tagján folyó transzláció közvetlenül a második cisztron (vagyis az idegen gén) startkodonja előtt fejeződik be. (A transzlációs stop helyét a plazmid szekvenciájának ismeretében pontosan meg tudjuk határozni.)

Ilyen elrendezést nem mindig könnyű kialakítani, ezért további ún. direkt klónozó vektorokat konstruáltunk. A pER23 plazmidból eltávolítottuk az alfa-peptidet kódoló gén 5' részét, a transzlációs startkodont közvetlenül megelező AluI hely és a már említett PvuII hely közötti darabot.

A két szabad vég összekapcsolása során egy új PvuII hely

keletkezett. Az így kapott plazmid (pER23 -ATG) lehetővé teszi tetszőleges gén ún. "tompa végű" (blunt end) klónozását az újonnan létrejött PvuII helyre. A gén a saját ATG transzlációs start kodonjával kell hogy kezdődjön, amely így alkalmas távolságra kerül a vektoron lévő riboszómakötőhelytől. A pER23 -ATG vektor kémiailag szintetizált gének klónozására rendkívül alkalmas. Hátránya, hogy a blunt end ligális nem eléggé hatékony és az ATG startkodon távolsága a riboszómakötőhelytől 2 nukleotiddal rövidebb az optimálisnál. (Ez az utóbbi hiányosság természetesen kiküszöbölhető, ha a szintetikus gén az ATG kodont megelőzően is tartalmaz 2 nukleotidot)

A következő lépésben egy szintetikus ClaI linkert éptítettünk be a pER23 -ATG plazmid PvuII helyére, és a vektorcsalád következő tagját kaptuk (pER2 +ATG plazmid). Ha az "iménti" szintetikus gént - amely ebben az esetben nem kell hogy tartalmazzon saját transzlációs startkodont - a pER23 +ATG plazmidban kívánjuk kifejeztetni, akkor a cél elérése érdekében az első lépésben a gén két végéhez szintetikus ClaI linkert kell kapcsolnunk, majd ClaI restrikciós enzimmel történő emésztés után a fragmentumot a vektorplazmid ClaI helyére klónozzuk. Ekkor a ClaI linkeren lévő ATG kodon szolgál transzlációs startként és távolsága a consensus Shine-Dalgarno szekvenciától éppen optimális lesz. (Természetesen nem szükséges ClaI linker használata, ha a szintetikus génen már eleve van ATG kodon és ClaI kompatibilis ragadós végekkel rendelkezik.)

A pER23 +ATG plazmid egy további származékában megintcsak a PiVX polilinkert építettük be a plazmid ClaI és HindIII helyei közé, vagyis az alfa-peptid gén maradék részét is eltávolítottuk. Az eredményül kapott pER23C-H vektorplazmidba EcoRI, BamHI, PstI, Bgl II, XbaI és HindIII helyekre is klónozhatunk idegen géneket, ezekben az esetekben azonban természetesen a vektor riboszómakötőhelye túl messzire kerül az inszert kezdetétől, így a beépített fragmentum saját transzlációs szignálokat kell hogy tartalmazzon.

5.3.5. A pER23TA vektorplazmid

A vektorcsalád eddig ismertetett tagjai közül valamelyikkel, minden alkalommal sikeresen megvalósítottuk az idegen gének kifejeztetését - az össz sejtfehérje 10-60 %-át kitevő mennyiségben - ahány esetben csak próbálkoztunk (konkrét példákat a fejezet végén említek). Egyes fehérjéket azonban csak bizonyos vektorokkal sikerült túltermeltetnünk. Így például a humán proinzulin nagy mennyiségben felhalmozódott a sejtben - fúziós peptid formájában - mikor a hosszú N-terminális fúziós partnert kódoló pM23 vagy pL23 vektort használtuk. Azonban ha a proinzulin gént a jóval rövidebb bakteriális génszakaszt hordozó pER234 plazmidba építettük be, a fúziós fehérje kimutatható mennyiségben nem akkumulálódott (Ugyanakkor 35S-methioninnal végzett pulzusjelöléssel a fehérje jelenléte kimutatható volt.). Vagyis láthatólag a rövid N-terminális alfa-peptid nem nyújtott kielégitő védelmet a proteázokkal szemben. A pM23 és pL23 plazmidok által szintetizált fúziós fehérjék azonban igen nagy molekulatömegűek és ebből a hasznos rész (a proinzulin) százalékosan nagyon kicsi. Vagyis hiába érünk el - az össz sejtfehérjére vonatkoztatva - akár 20-30 százaléknyi fúzós peptidet, ennek alig egy ötöde az inzulin. Ezért megkíséreltük adaptálni a vektorainkra a Sung és mtsai (1986) által javasolt módszert. Ezek a szerzők úgy találták, hogy egy rövid - 7 tagú - monothreonin vagy monoglutamin oligopeptid képes - N-terminális fúziós partnerként - stabilizálni E. coli sejtben a humán proinzulint. A pER23 +ATG vektorunkba ezért beépítettünk egy szintetikus oligothreonin kódoló DNS szekvenciát, kapcsoltan a proinzulin génnel, azonban Sung-ék állításától eltérően, nem kaptunk kimutatható akkumulációt. Ezzel szemben viszont, amikor az oligotreonin kódoló szintetikus DNS-t "szendvicsként" közrefogta a béta-galaktozidáz génnek egy igen rövid (16 aminosav hosszúságú) N-terminális darabja "balról" és a proinzulin gén

"jobbról", akkor a fúziós termék tekintélyes mennyiségben felhalmozódott (22. ábra). Minthogy ebben a plazmidban (pER23TI) a proinzulin kódoló szekvenciát közvetlenül megelőzi egy egyedi ClaI restrikciós hasítóhely, a gént követően pedig ugyancsak egyedi HindIII hely található, nem okozott nehézséget a proinzulin gén kicserélése a már jól ismert PiVX polilinker szekvenciával (pER23TA plazmid). Így a vektorcsalád, még pontosabban a fúziós vektorok újabb reprezentánsát kaptuk, amely elsősorban igen kisméretű peptidhormonok kifejeztetésésére bizonyult rendkívül alkalmasnak (pl. vasoaktiv intesztinális polipeptid Simoncsits és mtsai 1988.) (A vektorcsalád egyes tagjainak releváns régiói, és a létrehozásukhoz vezető lépések a 20. ábrán láthatók. A pER23TA plazmid leader régiójának szekvenciáját a 21. ábra mutatja.)

5.3.6. A vektorok felhasználása

Az általunk kifejlesztett expressziós vektorcsalád univerzálisan alkalmazhatónak bizonyult. Mint már említettem, a túltermeltetés minden alkalommal sikerült. A kifejeztetett idegen gének között prokarióta és eukarióta, szintetikus és természetes gének egyaránt előfordultak. A fehérjék mérete (molekulatömege) 3 kD-tól 120 kD-ig változott. Néhány példa a felhasználásra: HIV proteáz (Giam és Boros 1988), egy ismeretlen funkciójú bakteriális fehérje (Balikó és mtsai 1988), kollagén kötő domainek (Bányai és mtsai 1990, Bányai és Pathy 1991), BspI modifikációs metiláz (Pósfai és mtsai 1986), humán tumor nekrózis faktor (Mai és mtsai, nem publikált), humán inzulin A és B lánc (Simoncsits és mtsai, nem publikált), bakteriális luciferáz (Fabula J., nem publikált), E. coli béta-galaktozidáz (Lukácsovich T., nem publikált), szentjánosbogár (firefly) luciferáz (Lukácsovich T., nem publikált) stb. Egyes esetekben (pl. kloramfenikol-acetil-transzferáz vagy bakteriális luciferáz) a túltermelés egészen elképesztő mértékű volt. A sejt összes

PLH 4

50

HindIII ClaI EcoRI BamHI

AAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTCGCGCGACCGGATC

PstI 100

CGGGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCGGAGAACTGGTAGGTATGGAA

BglII XbaI HindIII

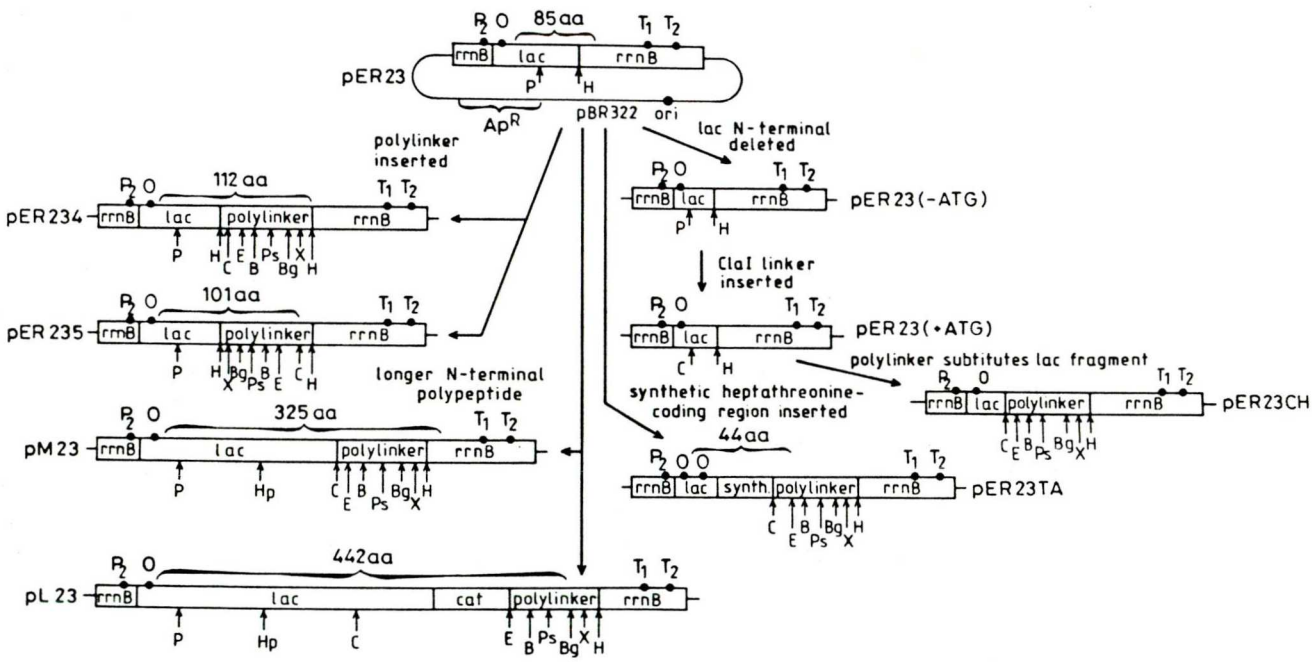
GATCTCTAGAAGCTT

19. ábra

A Pivx miniplazmid polilinker régiójának DNS nukleotidsorrendje

20. ábra

A vektorcsalád tagjai és a létrehozásukhoz vezető lépések



21. ábra

A pER23TI (pER23TA) plazmid leader régiójának DNS nukleotidsorrendje

AATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGGATTCACTGGC

Lac operator S.D. 7 bp.spacer

fusion point

CGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCATCGTATG

Lac operator S.D. 11bp.spacer

ACCACCACCACCACCACCACATCGATGTTT

ClaI Proinz.

fehérjéjének poliakrilamid gélelektroforézise, majd a megfestett gél denzitometrálása során az idegen fehérjének megfelelő csúcs alatti terület az egész görbe integrál értékének több mint 80 százalékát tette ki. (Valószínű azonban, hogy ebben az esetben a festék (coomassie-brillant blue R) kötődése a fehérjéhez már nem tekinthető lineárisnak). A 22. ábrán az idegen fehérjék túltermeltetésének néhány példáját láthatjuk.

Szükséges röviden kitérnem egy -a vektorrendszer felhasználóit érintő- fontos körülményre. Expressziós vektoraink a rendkívül erős promoter következtében - laktóz vagy IPTG inducer távollétében is csak $lacI^q$ genetikai markert hordozó, vagyis a lac represszor fehérjét túltermelő E. coli sejtekben tarthatók fenn stabilan. Gazdatörzsként ezért vagy JM törzseket használtunk, vagy a sejteket előzőleg transzformáltuk a pBR kompatibilis, Km^r, $lacI^q$ gént hordozó pVH1 plazmiddal (Günthert és mtsai 1986). Az indukált sejtekben a plazmidokon nagy gyakorisággal jelennek meg mutációk (ezzel a kérdéskörrel részletesen az 5.5. fejezetben foglalkozom), ezért az egyszer már indukált sejtkulturát tovább passzálni, vagy plazmidpreparálásra felhasználni nem szabad.

A nem indukált, $lacI^q$ sejtekben viszont vektoraink gyakorlatilag teljesen represszált állapotban vannak. (A pER23 plazmiddal transzformált JM107 sejt alfa-peptid aktivitása indukált és represszált állapotban több mint 3 nagyságrend különbséget mutat. (A nagyfokú represszió magyarázatára a 6.3. fejezetben még visszatérek.) Az ilyen mértékű repressziónak köszönhető, hogy vektorainkkal a sejt számára toxikus fehérjék (pl. proinzulin, BpsI modifikációs metiláz) is túltermeltethetők.

5.4.1. Plazmidstabilitás

Mint az irodalmi részben említettem, az idegen fehérjék túltermelése az esetek döntő hányadában rendívül nagy

22. ábra

Különböző idegen fehérjéket túltermelő E.coli sejtek össz-fehérje mintázata SDS-PAA gélelektroforézis során.

1. 2. 3. 4. 5.

1. pER23TI plazmiddal transzformált JM107 sejtkultúra indukálatlatlanul és
2. 3 mM IPTG-vel indukálva. (15%-os PAA gél)
3. VIP (vazoaktív intesztinális polipeptid) gént kifejező pM23 plazmiddal transzformált JM107 sejtkultúra indukálva,
4. az üres pM23 vektort hordozó sejtkultúra indukálva,
5. indukálatlan, kontroll sejtkultúra. (12%-os PAA gél)

megterhelést jelent a baktériumsejt számára, megzavarja annak ökonomikus működését. Ezért az ilyen sejt szelekciós hátrányában van a plazmid nélküli kontrol sejthez képest és annál jóval lassabban osztódik. Mindennek következtében, ha a fehérje kifejeződése plazmidhoz kötött formában történik (ahogy a mi expressziós vektoraink esetében is ez a helyzet), akkor a sejtek előszeretettel hagyják el plazmidjaikat, amennyiben külön szelekció nem hat a plazmidvesztés ellen. Ennek kiküszöbölésére kidolgoztunk egy olyan módszert, amellyel tetszőleges fermentációs gazdatörzsben tudjuk stabilizálni expressziós plazmidjainkat, antibiotikum felhasználása nélkül. Az irodalmi áttekintésben már említést tettem arról a plazmidstabilizálási módszerről, amely egymást feltételező törzs-plazmid párral dolgozik, ahol a törzs deficiens valamelyik létfontosságú kromoszómális génjében, ugyanakkor a plazmidon megtalálható ugyanennek a génnek egy működőképes kópiája. Így a plazmid - és egyben a létfontosságú gén - elvesztése a sejt halálát jelenti. A módszer gyakorlati alkalmazását erősen korlátozza, hogy egymást kölcsönösen feltételező, speciális törzs-plazmid párt igényel. Tetszőleges expressziós vektor stabilizálására tetszőleges fermentációs gazdatörzsben nem alkalmas. Adva volt tehát a feladat: miként tehető az eljárás általánosan alkalmazhatóvá?

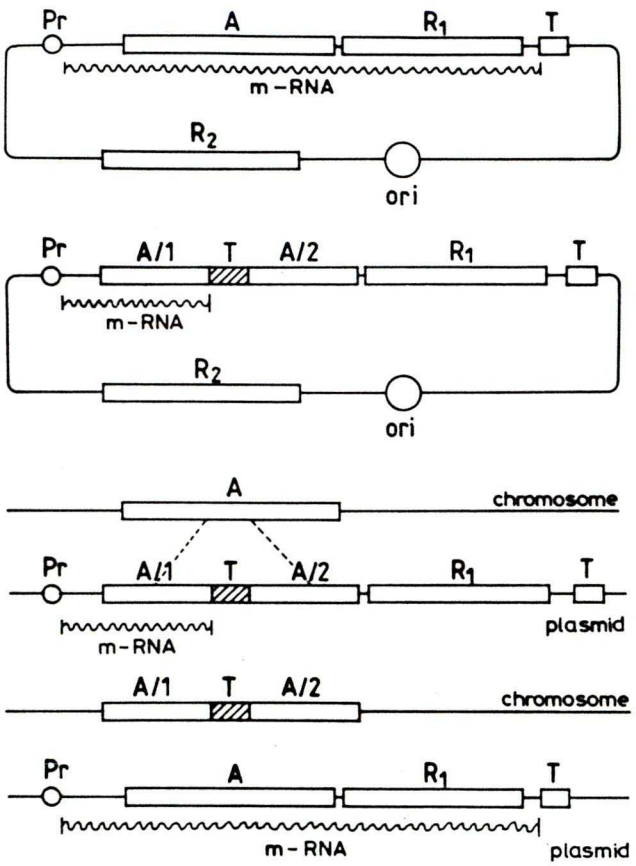
5.4.2. Egy elvi lehetőség a probléma megoldására

A problémát az alábbiakban ismertetett elgondolás alapján oldottuk meg. Kifejlesztettünk egy pozitiv szelekción alapuló metódust, melynek a segítségével könnyen nyomonkövethetjük egy plazmid-kódolt mutáns gén - kettős homológ rekombinációval történő - kicserélődését a kromszomális megfelelőjével.
A 23. ábrán láthatjuk az eljárás lényegének sematikus ábrázolását.

A lépések sorrendje a következő:
Először egy olyan plazmidot konstruálunk, amely tartalmaz egy

23. ábra

A plazmidstabilizációs eljárás elvének sematikus ábrázolása



(Részletes magyarázat a szövegben)

antibiotikum rezisztencia gént "R2" és egy további rezisztencia markert "R1" - a saját promotere nélkül - amely mesterséges operont képez egy klónozott, létfontosságú bakteriális génnel "A". Ebben a stádiumban a plazmidot hordozó sejt az "R1" és "R2" antibiotikumra egyaránt rezisztens. A második lépésben egy erős transzkripciós terminátort "T" építünk az "A" gén belsejébe, ezáltal az egész operont inaktiváljuk, vagyis a sejt szenzitivvé válik az "R1" antibiotikumra. Ezt követően a sejteket "R2" antibiotikummal kiegészített táptalajban növesztjük éjszakán át, majd "R1" antibiotikumot tartalmazó lemezre szélesztjük a sejtszuszpenzió 100 - 150 ul-ét. Újabb 20-24 óra elteltével a lemezről "R1" antibiotikumra rezisztens, kettős, homológ rekombinánsokat szelektálhatunk.

Ezekben a rekombinánsokban a plazmidon visszaalakult az eredeti állapot (ezért képesek a sejtek újból nőni "R1" antibiotikumon), ugyanakkor az "A" esszenciális génnek a plazmidon lévő inaktiv és a kromoszómán lévő ép kópiája mintegy helyet cserélt.

A pozitiv szelekció következtében lehetőségünk nyílik akár 10^9 sejtből is a néhány rekombináns gyors izolálására. Vagyis tetszőleges fermentációs baktériumtörzs és expressziós vektorplazmid esetében létre tudunk hozni olyan törzs-plazmid párt, ahol a fentieknek megfelelően az esszenciális gén egyetlen működő kópiája a plazmidon található, ezáltal a plazmid elveszthetetlen a sejt számára (Lukácsovich és Venetianer 1989, Lukácsovich és mtsai 1990/b).

5.4.3. A pER23L1TTCAT plazmid létrehozása

A 23. ábrán bemutatott megközelítés keresztülvihetőségének a bizonyítására egy pER-plazmid származékot (pER23L1TTCAT plazmid) készítettünk. A konstrukció létrehozása során esszenciális bakteriális génnek ("A") az L1 riboszomális fehérje génjét választottuk, szelekciós rezisztencia markerként ("R1") a

kloramfenikol-acetil-transzferáz (CAT) gén szolgált.

A pBR329 plazmid (Covarrubias és Bolivar 1982) 750 bp hosszúságú TaqI restrikciós fragmentjét (amely a teljes CAT gént tartalmazta a saját promotere nélkül) klónoztuk az előző fejezetben tárgyalt pER234 expressziós vektorplazmid egyedi ClaI restrikciós helyére. (Ez a plazmid - mint pBR322 plazmid származék - már eleve hordozza az ampicillin rezisztencia gént.). A következő lépésben az eredményül kapott plazmid két HindIII restrikciós hasítóhelye közül a promotertől távolabbit eltávolítottuk olymódon, hogy a plazmidot XbaI endonukleázzal megemésztettük, majd rövid ideig tartó Bal31 exonukleáz emésztést végeztünk és a plazmidot újból összezártuk T4 DNS ligázzal. Az így kapott plazmidok közül kiválasztottunk egy olyat, melyről az exonukleáz a XbaI hely tőszomszédságában lévő BglII és HindIII hasítóhelyeket is eltávolította (pER23-CAT plazmid). Ezt követően a pNO2016 plazmidból (Post és mtsai 1979) izoláltunk egy 1050 bp hosszúságú EcoRI-HphI fragmentumot (amely tartalmazta az L10 riboszomális fehérjét kódoló gén legnagyobb részét és az L1 riboszomális fehérjét kódoló gént teljes egészében). Klenow polimeráz enzimmel a fragmentum túlnyúló "ragadós" végeit tompa végekké alakítottuk és szintetikus HindIII linkereket ligáltunk hozzá. HindIII emésztés után a fragmentumot klónoztuk a pER23-CAT plazmid egyedivé vált HindIII helyére. Ez az intermedier plazmid - amely a pER23L1CAT elnevezést kapta - egy három génből álló mesterséges operont tartalmazott egy erős, indukálható promotert követően (LacZ-L10 fúzió, L1, CAT). A pER23L1CAT plazmidot Bgl II enzimmel megemésztettük és egy 320 bp hosszúságú BamHI fragmentumot építettünk az L1 gén belsejébe, amely a pKLA1 plazmidból származott (Orosz és mtsai közlés alatt) és az rrnB operon erős, rho-independens terminátorait tartalmazta. (A kloramfenikol szenzitiv transzformánsok restrikciós analízise során azt találtuk, hogy ezek mindegyike tandem két vagy több terminátor fragmentumot tartalmazott, ez azonban a további felhasználhatóságukat nem érintette. A terminátor fragment

duplikációjának lehetséges okát a 6.4. fejezetben tárgyalom).
Egy ilyen klónt (pER23L1TTCAT) választottunk a továbbiakban a rekombinációs kísérletekhez. A konstrukció itt leírt menetét a 24-dik ábra mutatja.

5.4.4. A rekombinánsok szelektálása

A pER23L1TTCAT plazmidot E. coli C600 törzsbe transzformáltuk és a transzformáns sejteket éjszakán át növesztettük 100 ug/ml ampicillinnel kiegészített YTB táptalajon. Ezt követően a sejtszuszpenzió 150 ul-ét 200 ug/ml kloramfenikolt és 1 mM IPTG-t tartalmazó YTA lemezre szélesztettük. Lemezenként 50-100 túlélő kolóniát kaptunk, amely kb. 10^{-6}-os gyakoriságnak felel meg. A rezisztens kolóniák valóban a kívánt kettős rekombináns genotípust mutatták, mint erről az alábbi kísérletek során meggyőződtünk:

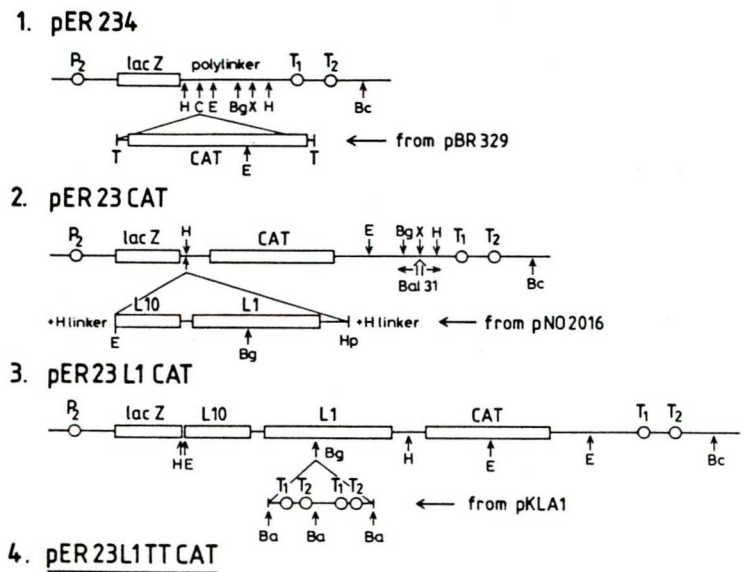
5.4.5. A rekombinánsok igazolása

1. A kolóniákból preparált plazmidok fizikai térképe valamennyi vizsgált esetben a pER23L1CAT, vagyis a terminátor fragmentum nélküli plazmid jelenlétét mutatta a sejtekben.
2. A kolóniákból preparált kromoszomális (vagy helyesebben össz-) DNS Southern-blot analízise megmutatta, hogy esetükben az L1 gén mérete a kromoszómán megnőtt 640 bp-ral, vagyis a dupla terminátor fragmentum méretével (25. ábra).
3. Lévén, hogy a rezisztens klónokban a létfontosságú gén működőképes formában csak a plazmidon volt jelen, a plazmidok ezekben a sejtekben - az előzetes várakozásnak megfelelően - rendkívül stabilnak bizonyultak.

A rezisztens (rekombináns) kolóniákat 3 mM IPTG-vel kiegészített YTB táptalajon, antibiotikum hiányában növesztettük éjszakán át. Ilyen körülmények között (több mint 10 generáción keresztül), valamennyi sejt megőrizte a plazmidját (Az ampicillin

24. ábra

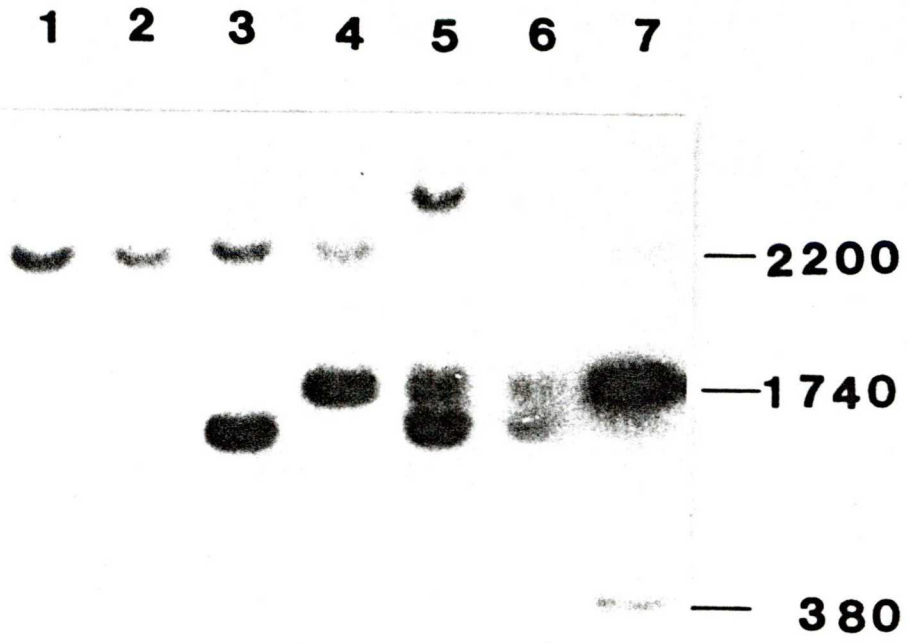
A pER23L1TTCAT plazmid létrehozása



(Részletes magyarázat a szövegben)

25. ábra

A homológ rekombináció megtörténtét igazoló Southern hibridizáció



A sejtekből preparált össz-DNS-t valamennyi esetben EcoRI enzimmel emésztettük. A hibridizációs próba a pNO2016 plazmid (Post és mtsai 1979) EcoRI, HphI fragmentuma volt, amely az L10 gén 3'részét és az intakt L1 gént tartalmazta.

1. E. coli C600 törzsből izolált DNS.
2. E. coli JM107 törzsből izolált DNS.
3. pER23L1CAT plazmiddal transzformált C600 sejtekből izolált DNS
4. pER23L1TTCAT plazmiddal transzformált C600 sejtekből izolált DNS
5. és 6. pER23L1TTCAT plazmiddal transzformált, és 200 ug/ml kloramfenikolon szelektált C600 sejtekből izolált DNS
7. Molekulasúly "marker"

rezisztencia megmaradását több száz esetben ellenőriztük, DNS szinten 24 kolóniát vizsgáltunk.). Ugyanilyen körülmények között a pER23L1CAT és a pER23L1TTCAT plazmiddal transzformált - nem rekombináns sejtek 55 illetve 50 %-ban elvesztették plazmidjukat.

5.4.6. IS10 inszerció

Egy rövid kitérőt szükséges tennem, amelyben megemlítek, egy - a módszer későbbi potenciális felhasználói számára - lehetséges zavaró körülményt. Amikor a rekombináns szelekciót JM107 törzsben kíséreltük meg, nagy számban kaptunk kloramfenikol rezisztens klónokat, ezek részletesebb analízise azonban meglepő eredményre vezetett. A belőlük preparált plazmidok nem a várt szerkezetet mutatták, vagyis nem a pER23L1CAT plazmidot (ill. ennek a plazmidnak és a PER23L1TTCAT plazmidnak a keverékét) kaptuk vissza, hanem egy nagy inszerciót találtunk a CAT gént közvetlenül megelőzően. Az inszertálódott DNS szekvencia analízise felfedte, hogy ezekben a plazmidokban az ismert mobilis genetikai elem, az IS10 "ugrott be" a plazmidba. Az IS10-ről ismeretes, hogy a DNS szekvenciában meghatározott consensus helyre képes beépülni és egy promotert hordoz, mely lehetővé teszi a szomszédos gének aktiválását (Ciampi és mtsai 1982). Úgy látszik, az IS10-et több kópiában hordozó JM107 sejtben az IS10 inszerció jóval nagyobb gyakorisággal következik be, mint a várt kettős homológ rekombináció, így a kloramfenikol szelekció elsősorban a "rosz" mutánsok megjelenését segíti elő. Az IS10-et nem hordozó C600 sejtek esetében hasonló hamis pozitív klónok megjelenését nem tapasztaltuk (és ugyancsak tudtunk rekombinánsokat izolálni JM107 törzsből is, amikor az L1 gént egy olyan DNS szakasszal helyettesítettük, amely - attól eltérően - nem tartalmazta 3' végén az IS10-et "befogadó" consensus szekvenciát. Ez utóbbi plazmid konstrukciót itt nem részletezem).

5.4.7. A pER23LCTI plazmid létrehozása, az "expressziós kazetta" és a "stabilizációs operon" összeépítése

Miután meggyőződtünk az eljárás alkalmazhatóságáról, természetesen célul tűztük ki valamelyik expressziós vektorunk stabilizálását, vagyis olyan plazmid előállítását, amelyik egyaránt tartalmazza a 6/23 promoter (vagy valamelyik származéka) által vezérelt "expressziós kazettát" és ettől szeparáltan az inaktivált L1 gén-CAT gén "stabilizációs operont". A feladat megvalósítására - a 26. ábrán bemutatott lépések során - a pER23LCTI plazmidot konstruáltuk. A plazmid az előző fejezetben tárgyalt pER23TI (humán proinzulint expresszáló) vektorplazmidba -az rrnB T1 és T2 terminátorokat követően - beépítve tartalmazza a "stabilizációs operont". Ez utóbbi ezúttal a lacUV5 promotert követően az (5' végén deléciós) L10 gén - L1 gén - CAT gén tagokból áll. Az L1 gén jelen esetben is két részre van osztva a belsejébe klónozott terminátor fragmentum következtében, amely leállítja a transzkripciót, így a CAT gén sem tud átíródni.

A konstrukció lépései részletezve:

1.) A korábban már ismertetett módon létrehoztuk a pER23L1CAT és a pER23TI (5.3.5. fejezet) plazmidokat. A pER234C plazmid a pER234 expressziós vektorplazmid ClaI helyére beépítve tartalmazza a pBR329 plazmidból származó - promoter nélküli - CAT gént egy 750 bp-os TaqI fragmentumon.

2.) A pER23L1CAT plazmidot EcoRI és HindIII enzimmel emésztettük és az emésztés során kapott kisebbik fragmentumot - amely az L10-L1 fúziós gént tartalmazta - beépítettük a hasonlóképpen emésztett pUC18 plazmidba (Yanisch-Perron és mtsai 1985).

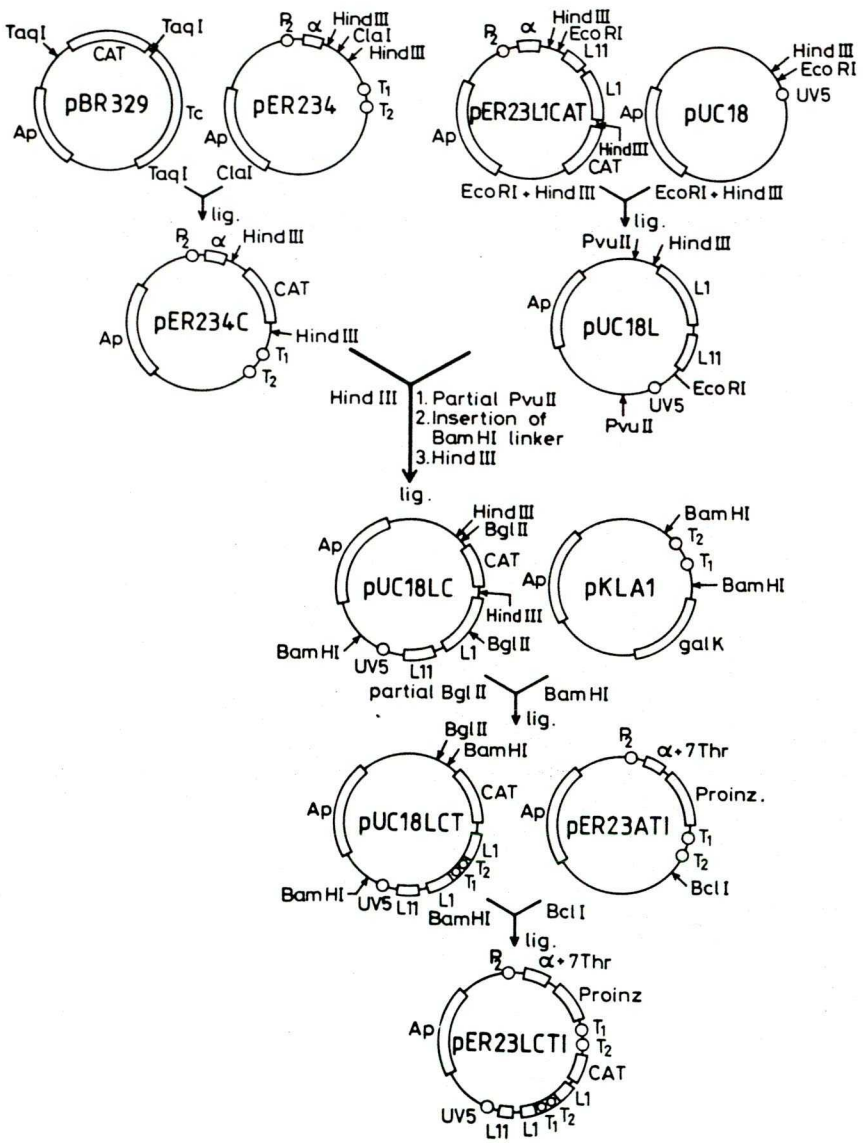
3.) Az eredményül kapott intermedier plazmidot részlegesen emésztettük PvuII enzimmel, és a lac UV5 promotertől upstream lévő PvuII helyre beépítettünk egy szintetikus BamHI linkert.

4.) Az így kapott plazmid HindIII helyére beépítettük a pER234C plazmidból HindIII emésztéssel kapott, promoter nélküli CAT gént.

5.) Az eredményül kapott pUC18LC plazmidot részlegesen

26. ábra

A pER23LCTI plazmid keletkezéséhez vezető lépések



(Részletes magyarázat a szövegben)

emésztettük BglII enzimmel és a pKLA1 plazmidból (Orosz és mtsai közlés alatt) BamHI emésztéssel nyert rrnB T1,T2 terminátor fragmentumot beépítettük az L1 gén közepébe. Ez a plazmid a pUC18LCT elnevezést kapta.

6.) A pUC18LCT plazmid BamHI emésztésével kapott kisebbik fragmentumot - amely az egész "stabilizációs operont" (lac UV5 promoter, L10-L1 gén fúzió, CAT gén) tartalmazta - beéptítettük a pER23TI - proinzulin expresszáló - vektorplazmid egyedi BclI helyére.

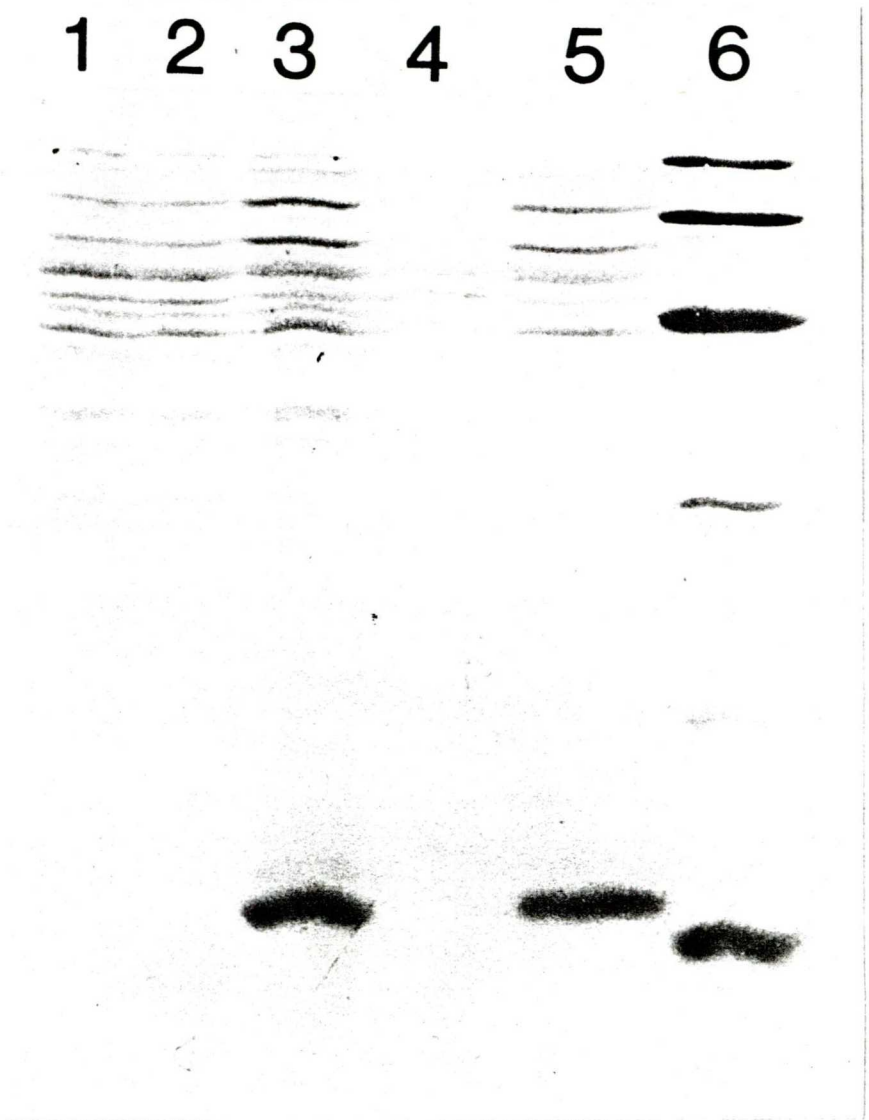
7.) A pER23LCTI plazmidon a proinzulin gént - az előző fejezetben leírt módon (lásd pER23TI - pER23TA plazmid átalakítás) - a piVX miniplazmid polilinker régiójára cseréltük. Ezáltal a plazmid bármilyen egyéb génexpresszió stabilizálására alkalmassá vált.

5.4.8. A plazmidstabilizálás hatása a proinzulin termelésre

E. coli C600 sejteket - amelyek már eleve hordozták a klónozott gén represszióját biztosító pVH1 plazmidot (Günthert és mtsai 1986) transzformáltuk a pER23LCTI plazmiddal. A transzformánsok így egyaránt rezisztensek voltak ampicillinre és kanamicinre, ugyanakkor nem nőttek kloramfenikolon. A sejteket éjszakán át növesztettük 100 ug/ml ampicillinnel és 50 ug/ml kanamicinnel kiegészített YTB táptalajon, majd a sejtszuszpenzió 150 ul-ét 200 ug/ml kloramfenikolt tartalmazó YTA lemezre szélesztettük. A túlélő kolóniák közül néhányról - az előzőekben leírt módszerek szerint bizonyítottuk, hogy ténylegesen kettős, homológ rekombinánsok, vagyis a kromoszomális L1 gén kicserélődött az - előzetesen a plazmidon lévő - inaktiv kópiával. A 27. ábra mutatja a rekombináns - vagyis plazmidstabilizált - klón proinzulin termelését -antibiotikum szelekció nélkül- a kontroll sejtekével összehasonlítva.

27. ábra

A plazmidstabilizáció hatása a rekombináns sejtek proinzulin termelésére, antibiotikum nélküli fermentáció során



A tenyészeteket OD_{550}=0.4 sejtsürüség értéknél indukáltuk 3 mM IPTG-vel. A sejteket 6 óra elteltével gyűjtöttük össze centrifugálással, és az össz-fehérje extraktumokat 15%-os PAA gélen futtattuk.

1. Túltermelő plazmid nélküli, kontroll E. coli C600(pVH1) sejtek
2. pER23LCTI plazmiddal transzformált C600(pVH1) sejtek Ap^+, $IPTG^-$ táptalajon növesztve
3. pER23LCTI plazmiddal transzformált C600(pVH1) sejtek Ap^+, 3 mM IPTG-vel kiegészített táptalajon növesztve
4. pER23LCTI plazmiddal transzformált C600(pVH1) sejtek Ap^-, 3 mM IPTG-vel kiegészített táptalajon növesztve
5. pER23LCTI plazmiddal transzformált rekombináns C600(pVH1) sejtek Ap-, 3 mM IPTG-vel kiegészített táptalajon növesztve
6. Molekulasúly "marker" (94, 67, 43, 30, 20.1, 14.4 kDa)

5.5.1. A mutációs ráta megnövekedése

A fehérjexpresszió optimalizására irányuló törekvéseink során egy további akadályba ütköztünk. A plazmidvesztés megakadályozása ellenére - éjszakán át tartó növesztés alatt - az expressziós vektorainkkal transzformált sejtek jelentős része elvesztette képességét a klónozott gén kifejezésére. (Kivételt képeztek azok a túltermelő klónok, melyek növekedési rátája nem csökkent a plazmid nélküli sejtekéhez képest. Pl. a CAT fehérje expressziója optimális körülmények esetén meghaladja a sejt össz fehérje szintézisének több mint a felét (5.3.6. fejezet), ugyanakkor a túltermelő sejtek nem osztódnak számottevően lassabban, mint a plazmid nélküli kontroll sejtek. Ezzel összhangban a CAT fehérjét expresszáló sejtkultúrából nem sikerült nem-termelő klónokat izolálnunk) A jelenség - miszerint a túltermelő klón fermentálása során nagy számban jelennek meg "impotens" sejtek - régtől fogva ismert, és aránylag egyszerűen magyarázható az általánosan elfogadott neo-darwinista elmélet alapján, amelynek lényege a következő:

Spontán fellépő mutációk fordulnak elő bizonyos gyakorisággal a DNS bármely pontján (bizonyos ún. forró pontoknál nagyobb frekvenciával mint egyéb helyeken). Előbb vagy utóbb véletlenszerűen bekövetkezik ún. promoter down mutáció is, amely az expressziós vektorplazmid promoterét "teszi tönkre". Természetszerűleg -az előzőekben már tárgyaltak alapján - az ilyen mutáció nagyfokú szelekciós előnyt jelent a mutáns számára az eredeti sejtekkel szemben, ezért a mutánsok gyorsan túlnövik azokat. Vagyis az elképzelés szerint a mutációs ráta nem függ a sejt növekedési körülményeitől, azonos értéket mutat a túltermelő plazmidot hordozó, valamint a kontroll sejtek esetében. Kérdés azonban, hogy ez a várakozás megfelel-e a valóságnak?

5.5.2. Mutációk a plazmid promoterrégiójában

Legelőször arra voltunk kíváncsiak, hogy a nem-termelővé vált klónokban valóban valamilyen down mutáció következett-e be. A pER23-as plazmiddal transzformált JM107 sejtkultúrát 100 ug/ml ampicillin és 3 mM IPTG jelenlétében éjszakán át növesztettük, majd a sejteket x-gal indikátorlemezre szélesztettük. A kinőtt telepeknek esetenként eltérő, de mindig jelentős hányada fehér volt, vagyis nem mutatott alfa-peptid aktivitást. Az ilyen nem termelő klónokból preparált plazmidokat újratranszformálva, az esetek jelentős részében megintcsak nem-termelő klónokat kaptunk, vagyis ténylegesen a plazmid stabil genetikai változása, mutáció következett be. Egy ilyen plazmid promoterrégiójának nukleotidsorrendjét meghatározva a feltételezett mutációt meg is találtuk, a -35-ös box szekvenciája TTGACT-ről TTGAGT-re változott.

5.5.3. Mutációk a plazmid egyéb génjeiben

A továbbiakban meg kívántuk vizsgálni, hogy a mutációk a promoterrégióra korlátozódnak-e, vagy ellenkezőleg, a plazmid egyéb részein is detektálhatunk változásokat. A kérdés eldöntésére a pER23LCTI plazmiddal (5.4.7. fejezet) transzformált és a kettős homológ rekombinációs eseményen átesett JM107 sejteket 3 mM IPTG-vel kiegészített YTB táptalajon növesztettük, amely nem tartalmazott antibiotikumokat. A sejtek - az előző fejezetben leírtaknak megfelelően - nem veszthették el plazmidjainkat, ennek ellenére a 13-dik - 14-dik sejtgeneráció három kísérlet átlagában - több mint 60 %-ban ampicillin szenzitív és kb. 20 %-ban kloramfenikol szenzitív klónokból állt. Mindkét antibiotikumra szenzitív volt a sejtek kb. 10 %-a. A sejtekből preparált plazmidok fizikai térképe - több restrikciós enzimmel végzett emésztés alapján - látszólag nem különbözött a kiindulási pER23LCI plazmidétól. Így fel kellett tételeznünk,

hogy a rezisztenciagének inaktiválását pontmutációk, vagy néhány bp hosszúságú mikrodeléciók okozták.

A proinzulin termelő képességét valamennyi vizsgált klón (kísérletenként 8-8 db.) elvesztette, így feltehetőleg a várt promoter down mutáció is bekövetkezett. Emellett azonban a sejtek több mint felében legalább még egy, a kettős szenzitív klónok esetében legalább még kettő független mutációs esemény valószínűsíthető. Természetesen ebből a kísérletből korrekt mutációs rátát nem lehet számolni, ugyanis az éjszakán át történő növesztés során a különböző mutáns sejtek eltérő sebességgel osztódnak és egy neutrális mutáció is felszaporodhat a sejtkultúrában, ha kapcsoltan fordul elő egy szelekciós előnyt jelentő másik mutációval (pl. az említett promoter down mutációval). Ennek ellenére annyit bízvást állíthatunk, hogy a túltermelő klónokban, az expressziós vektorplazmidokon igen nagy számban fordulnak elő olyan mutációk is amelyek látszólag közömbösek a sejt növekedése szempontjából. Nyitva maradt azonban a kérdés, hogy a mutációs gyakoriság megnövekedése csak a plazmid DNS-t érintően következik-e be, vagy ellenkezőleg a kromoszomális génekre ugyanúgy érvényes. Ha az utóbbi eset igazolódik, akkor általános jelenséggel állunk szemben, miszerint az idegen fehérje túltermeltetésére adott válaszként (általános stressz-válasz ?) a mutációs gyakoriság fokozódása következik be.

5.5.4. Mutációk a kromoszomális génekben

Elsőként a spontán streptomicin rezisztencia előfordulási gyakoriságát vizsgáltuk a pER23TI plazmiddal (5.3.5. fejezet) transzformált JM107 sejtekben. Éjszakán át történő növesztés után a sejtkulturák 150 ul-eit 15 ug/ml streptomicint tartalmazó YTA lemezre szélesztve azt tapasztaltuk, hogy az előzetesen IPTG-vel indukált sejtek között több mint egy nagyságrenddel több streptomicin rezisztens klón jelenik meg, mint az indukálatlan, kontroll baktériumkultúra esetében. (Az IPTG önmagában nem

bizonyult mutagénnek.)

A kísérlet eredménye indikációt jelentett arra nézve, hogy a jelenség valóban általánosnak tekinthető, ugyanakkor a streptomicin rezisztencia modellnek választása két különböző oknál fogva sem szerencsés. Egyrészt a streptomicin rezisztencia egy riboszomális fehérje megváltozása következtében alakul ki, így ellenvetésként felhozható, hogy a túltermelő sejt megterhelt transzlációs apparátusát érintő mutáció nem feltétlenül tekinthető függetlennek. A másik probléma, hogy a streptomicin rezisztencia kifejeződéséhez több sejtosztódás szükséges (Hayes 1964), ezért az indukció után a sejteket hosszabb ideig kell növeszteni. Ekkor azonban, az előzőekben leírtak alapján egzakt mutációs ráta nem számolható.

Ezért a továbbiakban a valin rezisztens klónok megjelenési gyakoriságát vizsgáltuk a sejtkultúrákban. A valin bioszintézis kezdeti lépései megegyeznek az izolecinéval és a valin mindkét aminósav bioszintézisének közös feed back inhibitora. Ezért a vad típusú E. coli sejtek - izoleucin távollétében - nem nőnek valint tartalmazó minimál táptalajon. Léteznek azonban olyan mutációk, melyek következtében - kerülő úton - valin jelenlétében is képes a sejt izoleucint szintetizálni.

Kísérletünk menete a következő volt:

100 ug/ml ampicillinnel kiegészített M9 minimál táptalajon éjszakán át növesztettünk $37^{o}C$-on, pER23TI plazmiddal transzformált JM107 sejteket. A baktériumkultúra 1-1 ml-ét 100 ml M9 táptalajra oltottuk és az egyik tenyészetet 3 mM IPTG-vel indukáltuk. A két tenyészetet $37^{o}C$-on 1 órán át rázattuk, majd a sejteket lecentrifugáltuk és 0,5 mg/ml valint tartalmazó M9 agar lemezre szélesztettük. A kísérlet eredményét a 2. táblázat mutatja. Jól látható, hogy az indukció - vagyis a túltermelés "beindítása" - több mint egy nagyságrenddel megnövelte a valin rezisztens klónok előfordulási gyakoriságát.

Érdekes kérdés, hogy a mutációk számának - a túltermelés során bekövetkező - megnövekedése valójában milyen tényezőre

2. táblázat

A túltermelés hatása a valin rezisztens klónok megjelenési gyakoriságára

kísérletek:	a valin rezisztens kolóniák száma	
	IPTG+	IPTG−
1.	384	27
2.	272	18
3.	546	25

3. táblázat

Az anaerobiózis hatása a valin rezisztens klónok megjelenési gyakoriságára

kísérletek:	a valin rezisztens kolóniák száma	
	levegőztetéssel	levegőztetés nélkül
1.	8	37
2.	3	42
3.	5	25

vezethető vissza. Nagyon valószínűnek tűnik, hogy a jelenség nem lép fel általános érvénnyel minden túltermelő klón esetében, hiszen - mint korábban említettem - a CAT fehérjét igen nagy mennyiségben szintetizáló sejtek között nem találtunk megnövekedett számban mutánsokat. Vagyis feltehetőleg nem egyedül a transzkripciós vagy transzlációs apparátus fokozott megterhelésének következtében nő meg a mutációk száma. Ugyancsak kizárható az a lehetőség, hogy a humán proinzulin fehérje toxicitása magyarázná a magasabb mutációs rátát, minthogy az alfa-peptid a szó hagyományos értelmében nem nevezhető toxikusnak (sejtidegennek), mégis a pER23-as plazmiddal transzformált sejtek is hasonlóképpen viselkednek. Közös jellemzője azonban a két (pER23, illetve pER23TI plazmiddal transzformált) klónnak, hogy - indukált állapotban - jóval lassabban nőnek a plazmid nélküli kontroll sejtekhez képest. Vagyis elképzelhető volt az eddigiek alapján, hogy a növekedési ráta - különböző hatásokra bekövetkező (?) - csökkenése tehető felelőssé a mutációk megnövekedett számáért. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogy - egyebekben azonos körülmények mellett - a levegőztetés elhagyása milyen hatást gyakorol a mutások előfordulási gyakoriságára a sejtkultúrában.

5.5.5. A részleges anaerobiózis hatása a mutációs gyakoriságra

Párhuzamosan növesztettünk M9 táptalajon két JM107 sejtkultúrát éjszakán át, 37^{o}C-on, az egyiket intenzíven rázatva, a másikat rázatás nélkül. 16 óra elteltével a rázatott baktériumkultúra sűrűsége durván kétszerese volt a másikénak (0.8 illetve 0.4 OD_{550} érték). Az eltérő sejtsűrűséget figyelembe véve a rázatott kultúrából 100 ul-t, a másikból 200 ul-t szélesztettünk 0.5 mg/ml valint tartalmazó M9 agar lemezre. Az eredményt a 3. táblázat mutatja. A részleges anabiózis /illetve a növekedési ráta csökkenése (?)/ hasonló, bár mértékében kisebb mutációs ráta fokozódást eredményezett, mint a proinzulin fehérje

túltermelése.

A 6.5. fejezetben tárgyalom egy általános stressz-válasz lehetőségét, amely a sejtnövekedés gátlása esetén a spontán mutációs frekvencia emelkedésében nyilvánulna meg.

5.5.6. A recA gén szerepe a mutációs gyakoriság fokozódásában

Mint az irodalmi összefoglalóban (1.5.2. fejezet) említettem, a recA fehérje -a DNS károsodásra adott SOS-válasz keretében- a DNS-polimeráz III enzim templát-függőségét csökkentve a mutációs frekvencia növekedését eredményezi. Feltételeztük, hogy a recA indukció esetünkben is szerepet játszhat, ezért megvizsgáltuk a proinzulin túltermelésnek a valin rezisztens klónok előfordulására gyakorolt hatását a recA minusz E. coli HB101 törzsben is. A kisérlet elrendezése az 5.5.4. fejezetben leírtakéval minden tekintetben megegyezett. Az eredményt a 4. táblázat mutatja. Látható, hogy ebben az esetben az indukciónak semmilyen hatása nem volt a mutánsok előfordulási gyakoriságára, vagyis a recA fehérje - és a hibára hajlamos javító mechanizmus - szerepe erősen valószínűsíthető. (Feltehetően ugyancsak a recA fehérje hiányának a következménye, hogy az alap mutációs gyakoriság ugyancsak szignifikánsan alacsonyabb a HB101 sejtkultura esetében.)

4. táblázat

A túltermelés hatása a valin rezisztens klónok megjelenési gyakoriságára a recA HB101 törzsben

kísérletek		a valin rezisztens kolóniák száma	
		IPTG⁻	3 mM IPTG
E. coli HB101(pVH1) transzformálva			
pER23ATI plazmiddal	1.	5	3
	2.	0	0
	3.	4	2
túltermelő plazmid nélkül	1.	0	1
	2.	0	8
	3.	2	0

6. Az eredmények megvitatása (diszkusszió)

6.1. A shift-up reguláció

Az 5.1. fejezetben bemutatott eredmények demonstrálták, hogy a hosszabb (a P2 promoter esetében legalább 30 bp hosszúságú) rrnB leader szekvenciát megőrző pER-plazmidokkal transzformált E.coli sejtekben az alfa-peptid aktivitás a sejt növekedési ciklusa során több mint 10-szeres különbséget mutat, vagyis szintézise szabályozott. A reguláció nem köthető magához a fehérjéhez, ugyanis az említett leader szekvenciát nem tartalmazó pER23-as plazmiddal transzformált sejtek viselkedése ettől eltérő - gyorsan növekvő, majd igen magas szinten állandósuló alfa-peptid aktivitást mutatnak - ebből következően a jelenség elsősorban transzkripciós szintű. Bizonyítottnak vehetjük, hogy az általunk shift-up regulációnak elnevezett szabályozás a riboszomális RNS promotereknek a sajátsága, amely elsősorban a promotereket közvetlenül követő - 30-50 bp hosszúságú - leader szakaszhoz kapcsolható. A leader szekvenciának a jelenléte esetén a promoter aktivitása gyorsan nő, - ha stacioner állapotban lévő sejteket friss táptalajra oltunk át, illetve ha minimál táptalajon exponenciálisan növekvő sejteket gazdag táptalajra helyezünk - majd az aktivitás rödid idő elteltével egy alapszintre esik vissza. A P2 promoter aktivitásának hasonló, hirtelen emelkedését - a stacioner fázisból történő kinövesztés során - már korábban megfigyelték (Sarmientos és mtsai 1983), ennek ellenére a szakirodalomban általánosan elterjedt az a vélemény, hogy a P2 promoter aránylag gyenge konsitutiv promoter, amely a sejtek növekedési rátájától függetlenül, egyforma erősséggel dolgozik, és a riboszomális RNS-ek alapszintéziséért felelős. A mi kísérleteink alátámasztották Sarmientosék korábbi megfigyelését és kiegészítették egyrészt azzal, hogy hasonló körülmények között

a P1 promoter viselkedése is hasonló, valamint hogy a jelenség ennél általánosabban, a metabolikus shift-up egyéb formáira is jellemző.

A megfigyelt jelenség feltétlenül különbözik a növekedési ráta kontrolltól, egyrészt mert a változás sokkal drámaibb, másrészt mert a hatás csak időleges, kevesebb mint 2 óra elteltével - még mindig a sejtnövekedés exponenciális szakaszában - a promoterek aktivitása már gyorsan csökken. A shift-up reguláció - úgy a növekedési ráta kontrolltól, mint egyéb ismert szabályozásoktól - különbözik abban is, hogy mely DNS szakaszhoz köthető a hatásának kifejtése. Mint az irodalmi áttekintésben említettem (2.2.4. fejezet), a növekedési ráta függő kontroll és a riboszomális feed-back szabályozás a P1 promoter transzkripciós iniciációs pontjától számított -51-es és -20-as nukleotidok közé lokalizálható, míg a stringens kontroll az iniciációs pont közvetlen környezetében (diszkriminátor szekvencia) fejti ki hatását. Ez utóbbival kapcsolatban mi is végeztünk kísérleteket (5.1.13 fejezet), azonban nekünk sem sikerült közvetlen összefüggést kimutatnunk a ppGpp szint és a shift-up reguláció között. Bonyolultabb a helyzet az antiterminációval kapcsolatban (2.4. fejezet). A 3 antiterminációs box (B,C és A) közül az első (B) teljes egészében épen maradt a shift-up regulációt már mutató pER1 plazmid P2 promoterét követően. Az antiterminációs mechanizmus részvételét a shift-up szabályozásban nem zárhatjuk ki teljesen, bár erősen kétségessé teszi az a tény, hogy a P1 promotert követő leader szakaszon nem lelhetők fel antiterminációs boxok, ugyanakkor a shift-up reguláció a P1 promoterre is "érvényes". Nem teszi egyszerűbbé a képet a gyakorlatilag teljesen inaktiv pIII-es plazmid "esete", mely ugyanakkor in vitro promoteraktivitása tekintetében semmivel sem marad el a pER23 plazmidtól.

Az összes információ figyelembevételével egy plauzibilis modell állítható fel, amely semmiben sem mond ellent a kísérleti tényeknek. A pIII-es plazmid in vivo és in vitro

promoteraktivitása közötti több nagyságrendes különbség legkézenfekvőbb magyarázata, ha feltételezzük, hogy az élő sejtben jelen van egy olyan faktor (vagy általánosabban fogalmazva egy olyan tényező), amely a leegyszerűsített in vitro rendszerből hiányzik. Tételezzük fel továbbá, hogy ez a faktor egy represszor protein, amely az rrnB P2 promotert közvetlenül követő 13 bp hosszúságú G/C gazdag leader szekvenciához képes kötődni. Ugyanakkor a leader szekvencia ezt követő, inkább A/T gazdag szakaszához egyéb faktor (vagy faktorok) kötődhetnek, amely (vagy amelyek) a represszor hatását képesek időlegesen felfüggeszteni.(Alternativ magyarázatként elképzelhető, hogy ez utóbbi faktor, vagy faktorok kapcsolatba hozhatók az említett antiterminációs faktorokkal és nem a DNS-hez, hanem - a transzkripció során - a mRNS-hez kötődnek).

A modellnek megfelelően a pIl1-es és a pER23-as plazmid két ellentétes végletet jelent. A pIl1-es plazmid, amely a leader szekvenciának csak a G/C gazdag részét tartalmazza, állandóan represszált állapotban van, míg a pER23-as plazmidon lévő promoter "kivonja magát" a shift-up reguláció "hatálya" alól, állandóan teljes intenzitással dolgozik. Ugyanakkor a pER1-es plazmid esetében, valamint a természetes rRNS operonokon a represszor és a "mentesítő fehérje" aktuális koncentrációja dönti el, hogy a promoter a maximális aktivitása hány százalékának megfelelően működik. Metabolikus shift-up, vagy stacioner sejtkultúrából történő kinövesztés után ez az arány a mentesítő fehérje szempontjából kedvező, később viszont a represszor javára tolódik el. Felmerül a kérdés, hogy - amennyiben a modell igaz - a represszor szintjének növekedése, vagy a mentesítő fehérje koncentrációjának csökkenése folytán következik-e be a promoteraktivitás gyors csökkenése a maximum elérése után? A kérdés megválaszolását csak indirekt bizonyítékok segítik:

Majdnem bizonyos, hogy a riboszomális RNS promoterek aktivitásának egy nagyságrendet meghaladó változása a sejnövekedés során, nem kerülte volna el más kutatók figyelmét,

és az is valószínűtlen, hogy a normál sejtben a kromoszomális rRNS operonokon a promoterek aktivitása ilyen mértékű ingadozást mutatna. Nagyon valószínű tehát, hogy az általunk használt kísérleti rendszerben -ahol a vizsgált szabályozó régió nagykópiaszámú plazmidon található- felerősített hatással állunk szemben.

Kísérleteinkekel összhangban van Pato és Meyenburg (1970) megfigyelése, akik azt találták, hogy metabolikus shift-up során a riboszomális RNS szintézis relativ sebessége gyorsan nő, és rövid idő alatt magasabb értékre fut fel, mint ami az új növekedési rátának megfelelne (túllövés vagy overshoot), majd hamarosan újra csökkenni kezd, míg az új, stabil szintézisrátát el nem éri. Mind az overshoot mértéke (1,5-2-szeres) mind a történés ideje (kb. 20 perc) jóval kisebb azonban, mint a mi esetünkben.

Végig kell gondolnunk, hogy az említett alternativ lehetőségek közül melyik magyarázza a felerősített, dózisfüggő hatást. Ha a "mentesítőfehérje" lenne a limitáló faktor, és koncentrációjának a csökkenése okozná a promoterek aktivitásának a csökkenését, akkor a dózisfüggés éppen ellentétes előjelű lenne. A plazmidokon, sok kópiában jelenlevő szabályozó régiók "kititrálnák" a mentesítőfehérjét, így a promoteraktivitás csökkenése hamarabb következne be és az overshoot is kisebb lenne, mint a normál sejt esetében. Ezzel szemben, ha feltételezzük, hogy a represszor fehérje koncentrációja növekszik shift-up után, akkor a gondolatkísérlet a valósággal megegyező eredményt ad. Ebben az esetben a plazmidok a represszort titrálják ki, ami valóban fokozott és időben elnyújtott hatást eredményez.

A tisztesség okán meg kell említenem, hogy a pIll-es plazmid "viselkedése" másképpen is magyarázható. Ismert az irodalomból, hogy a DNS fizikai állapota jelentősen befolyásolja az egyes gének kifejeződését (Kano és mtsai 1981, Oostra és mtsai 1980). A sejtben lévő és a preparált plazmid feltekeredettségi

("supercoildicitási") foka különböző lehet. Elképzelhető, hogy az in vivo plazmidon lévő promoter olyan topológai állapotban van, hogy az RNS polimeráz nem képes felnyitni az említett 13 bp hosszúságú, G/C gazdag, rendkívül kompakt DNS szakaszt, és a transzkripció iniciációja nem következik be. Vagyis az a tényező, amelyről az imént beszéltem - és amely különbözik az in vivo és in vitro rendszer esetében - nem más, mint a DNS eltérő topológiai állapota, amely a giráz-topoizomeráz rendszer működése következtében alakul ki (ennek némiképp ellentmond az a tény, hogy a pIII-es plazmid egyformán inaktivnak bizonyult a giraz-mutáns JM107 törzsben ugyanúgy, mint a vad típusú girázt tartalmazó JM101 törzsben). Ha a pIII-es plazmid inaktivitása valóban artefaktum, az a megadott modellt csak egyszerűsíti, ugyanis ebben az esetben a mentesítőfehérje létezését sem szükséges feltételeznünk, a pER-plazmidok viselkedése egyedül a represszorral jól magyarázható. Régóta ismeretes, hogy metabolikus shift-up után elsőként a rRNS bioszintézis rátája nő meg, amit az egyéb növekedési paraméterek lassabban követnek. (Bremer és mtsai 1973, Nomura és mtsai 1984). Ezt a gyors változást az RNS polimeráz molekulák rendkívül gyors újrarendeződése okozza, a sejt átcsoportosítja a rendelkezésre álló polimeráz molekulákat a rRNS génekhez.

Az ismert kép most azzal egészíthető ki, hogy a sejtekben egyébként is jelenlévő represszor szintje a shift-up után szintén nő és a Pato és Meyenburg (1970) által megfigyelt kezdeti overshoot után gyorsan az új egyensúlynak megfelelő szintre állítja be az rRNS szintézisrátáját.

Magától értetődő, hogy a shift-up reguláció adaptiv előnyt jelent az új környezetbe kerülő E. coli sejtek számára. Metabolikus shift-up során azok a sejtek bírnak szelekciós előnnyel a többi sejttel szemben, amelyek a leghamarabb képesek a tápanyagok feldolgozására (katabolizálására). Ehhez szükséges feltétel a katabolikus enzimek szintézise, illetve legelsősorban a fehérjeszintetizáló apparátus gyors kiépítése. A sejt ilyenkor

nem "spórolhat", minden azon múlik, hogy a fehérjeszintézis milyen gyorsan és mekkora kapacitással indul be. Ugyanakkor az ilymódon előnyt szerzett sejteknek a továbbiakban, még az exponenciális növekedési fázis során sincsen szükségük olymértékű riboszómális szintézisrátára, mint amekkora a kezdeti előnyt biztosította. Ellenkezőleg, a sejt egyéb "feladatai" ellátásának a rovására menne, ha az rRNS-ek szintézisét némiképp nem fékezné. Ez utóbbi feladatot hatjta végre feltételezéseink szerint az általunk felfedezett represszor.

Természetesen állításunkat - miszerint a shift-up szabályozás kevésbé markáns formában a normál sejt esetében is létezik - legegyszerűbben úgy bizonyíthatjuk, ha az alfa-peptid génhez hasonló markergént építünk be valamelyik kromoszomális rRNS operonba. Ilyen klónok előállítása folyamatban van, a velük folytatott mérésekből szeretnénk részletesebben megismerni a shift-up reguláció természetét és információkat kívánunk kapni a kromoszomális rRNS operonok feltételezett funkcionális heterogenitásáról is. Felmerül a kérdés, hogy milyen tényleges bizonyítékokkal rendelkezünk a represszor létezését illetően? A represszor fehérje klónozására folytatott kísérletek mindmáig nem jártak eredménnyel. A sikertelenség egy lehetséges oka, hogy klónozási stratégiánk represszor mutáns törzs izolálása volt - Tn5 inszerciós mutagenezissel (DeBruijn és Lupski 1984) - majd később szerettük volna a Tn5 transzpozont tartalmazó kromoszomális DNS szakaszt klónozni.

Sajnos már az inszerciós mutánst sem sikerült létrehoznunk, könnyen lehet, hogy azért nem, mert a represszor fehérje létfontosságú a sejt számára, így a gén nem inaktiválható. A gélretardációs kísérletek ugyanakkor kimutatták, hogy a coli sejtben léteznek a feltételezett target szekvenciához specifikusan kötődő fehérjék (Csiszár és mtsai 1990). Semmilyen ismeretünk nincs a shift-up szabályozás szignálját illetően vagyis hogy milyen molekula vagy molekulák közvetítik az információt a tápanyagellátottságról a szabályozásban résztvevő

fehérjék felé. Ez a szignál különben a "közönséges" növekedési ráta kontroll esetében sem ismert.

Röviden vázolok még egy körülményt, amely esetlegesen relevanciával bírhat az általunk vizsgált regulációt illetően. Újabban Nilsson és mtsai (1990) közölték, hogy a FIS fehérje egy -formálisan a shift-up regulációhoz hasonló- szabályozást valósít meg az rrn P1 promoterek esetében. A fehérje a P1 promoter UAS-jához kötődik és a promoter aktivitását többszörösére fokozza. A FIS koncentráció változása - stacioner sejtkulturából történő kinövesztés során - rendkívüli hasonlóságot mutat az általunk megfigyelt - shift-up regulációt mutató - alfa-peptid kinetikai görbékkel. A hasonlóság természetesen lehet a véletlen műve is, annál is inkább, mert a P2 promotertől downstream - ahol feltételezésünk szerint a shift-up reguláció hat - az egyébként igen lazán meghatározott FIS kötőhely (consensus) is csak torzítottan található meg. Ugyancsak ellene szól a feltételezésnek, hogy a FIS fehérje a P1 promoter aktivitását fokozza, ugyanakkor gondolatkísérletünkben az imént arra a következtetésre jutottunk, hogy a shift-up regulációt represszor természetű faktor valósítja meg. Ennek ellenére nem zárhatjuk ki teljesen a lehetőséget, hogy a szabályozó fehérjék kölcsönhathatnak - közvetlenül, vagy fehérje-fehérje kölcsönhatásokon keresztül-, egymástól távolabb elhelyezkedő DNS szekvenciákkal, és így valósíthatják meg a riboszomális RNS gének expresszijának szabályozását. Hasonló mechanizmust írtak le a gal, deo és lac operonok esetében (Mandal és mtsai 1990, Kramer és mtsai 1987, Amouyal és mtsai 1989).

A FIS protein esetleges részvételéről a P2 promoter aktivitásának szabályozásában, a következő fejezetben lesz szó.

6.2. Promotererősség

Az 5.2. fejezetben elvégzett kísérletek során néhány látszólagos ellentmondás megoldását kívántuk meglelni. Választ reméltünk kapni az alábbi kérdésekre:

1. Miként lehet összegyeztetni két általánosan tényként elfogadott elképzelést, miszerint egyrészt az E. coli promoterek annál erősebbek, minél kevesebb eltérést mutatnak az ún. consensus promoter szekvenciához képest, ugyanakkor in vivo a legnagyobb intenzitással a riboszomális RNS promoterek működnek (a teljes RNS szintézis több mint 50 százaléka az rRNS promotereken folyik), annak ellenére, hogy ezeknek a promotereknek a szekvenciája több ponton eltér a consensustól?

2. Ha nem a consensustól eltérő nukleotidsorrend, akkor milyen egyéb szerkezeti elem okozza a rRNS promoterek rendkívüli erősségét?

Vizsgálataink kiindulópontjául az rrnB P2 promotert, illetve annak a shift-up szabályozás targetjeként azonosított DNS szakasztól megfosztott (és ezáltal a szabályozás "hatálya" alól kivont) változatát, a 6/23-as promotert választottuk. Kimutattuk, hogy a 6/23-as (vagyis a "regulálatlan" rrnB p2) promoter adekvát rendszerben összehasonlítva a consensus tac promoterrel, annál valóban erősebbnek bizonyult. Másfelöl viszont, amikor a 6/23-as promoter konzervativ boxainak a szekvenciáját a consensuséval megegyezővé változtattuk, a promoter erőssége jelentősen tovább fokozódott. Kimondhatjuk tehát, hogy az az állítás, miszerint a coli promoter erőssége korrelál a consensus szekvenciához való hasonlóságának mértékével, mindig csak egy adott promoter esetében igaz. Más szavakkal, feltételezhetően valamennyi promoter aktivitása egy egyedi maximum érték felé közelít, amikor a promoter nukleotidsorrendjében a consensus szekvencia "irányába

mutató" változások történnek. Ez a saját maximum érték azonban minden promoter esetében más és más, ezért fordulhat elő, hogy valamely promoter gyengébbnek bizonyul egy másikhoz képest, annak ellenére, hogy az első promoter konzervativ boxainak nukleotidsorrendje azonos a consensus szekvenciával, a másodiké viszont különbözik tőle.

A gondolatmenetből nyilvánvalóan következik, hogy a promoterek aktivitásának meghatározásában egyéb szerkezeti elemek is fontos szerepet játszanak. Ezért a továbbiakban megkíséreltük azonosítani azt a DNS szakaszt, amelyik felelőssé tehető a 6/23-as promoter rendkívüli erősségéért. A formális logika szabályai szerint a szóbanforgó "aktivátor" DNS szakaszt 3 helyen kereshettük, a -35-ös konzervativ hexanukleotidtól upstream, a -10-es boxtól downstream, vagy a két konzervativ box közötti ún. spacer régióban. A spacert illetően, különböző megfontolások alapján "elejtettük a gyanut". A 6/23-as promotertől downstream az rrnB eredetű szekvencia mindössze néhány bp-ra korlátozódik, így már eleve valószínűtlen volt, hogy az aktivátort itt találjuk meg. Ennek megfelelően egy 4 bp-os downstream deléció (6/23 -Nsi promoter) nem csökkentette, ellenkezőleg tovább növelte a promoter aktivitását. Így - kizárásos alapon - a konzervativ boxoktól upstream elhelyezkedő DNS szakasz maradt az aktivátor régió egyedüli jelöltje. A riboszomális P2 promoterek esetében azonban UAS létezését mindmáig nem írták le.

Kísérleteink során egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a 6/23-as promoter az erősségét elsősorban a -35-ös boxtól upstream található DNS szakasznak köszönheti. Ennek a régiónak az eltávolítása, vagy poziciójának megváltoztatása (11 bp-ral "balra" helyezése) a promoter aktivitásnak drasztikus csökkentését okozta. Vagyis ezt a DNS szakaszt a továbbiakban joggal nevezhetjük UAS-nak.

Jelenleg nem rendelkezünk információval azt illetően, hogy az általunk felfedezett UAS hogyan fokozza a promoter aktivitását. Mint az irodalmi összefoglalóban már említettem, a coli UAS-ák

vagy különleges DNS szerkezetük (hajlott vagy "bent" DNS) következetében (faktor independens módon), vagy szabályozó fehérjék kötődése folytán (faktor dependens módon) fejtik ki hatásukat, illetve a kétféle mechanizmus kapcsoltan is előfordulhat. Az rrnB P2 promoter upstream régiója - az eddigi kísérleti adatok és elméleti megfontolások alapján - nem látszik különlegesnek, nem utal bent DNS szerkezetre. Az aktivátor hatás kifejtése nem mutatja a P1 UAS távolságfüggésének említett 11 bp-os periodicitását sem (2.3. fejezet). Nincsenek adataink arra nézve sem, hogy kötődnek-e fehérjék ehhez a DNS szakaszhoz. A FIS transzaktivátor fehérje, amely az rrnB P1 promoter UAS-hoz kötődik és a promoter aktivitását többszörösére növeli, meghatározott DNS szekvenciát (consensust) ismer fel (Nilsson és mtsai 1990). Ez a consensus szekvencia a P2 promotert megelőzően nem lelhető fel, így valószínűtlennek tűnik a fehérje részvétele a promoter aktivitásának fokozásában. Továbbra is nyitott maradt tehát a kérdés, hogy az általunk felfedezett UAS, faktor dependens vagy faktor independens módon fokozza-e a P2 promoter aktivitását. Kísérleteket folytatunk annak megválaszolására is, hogy általában az UAS-ák mennyire tekinthetők önálló szerkezeti és funkcionális elemeknek, vagyis mennyire függetleníthetők a saját promotereiktől. Jelenleg egy "referenciapromoter" elé építünk be különböző UAS-ákat (rrnB p1, rrnB p2, Tac stb.) és arra a kérdésre kívánunk választ kapni, hogy a független promoter aktivitását az egyes UAS-ák - különböző körülmények között - milyen mértékben fokozzák.

Még egy problémára szükséges kitérnem, nevezetesen, hogy valójában mennyire is erős a 6/23-as promoter. Eddig ezt a kérdést csak kerülgettem, illetve mindig azt a választ adtam, hogy "nagyon". A figyelmes olvasó számára már az eddigiekből kitűnik, hogy a promoteraktivitások körül valami nincsen rendben. Az irodalmi összefoglalóban már említettem, hogy általánosan elfogadott vélemény szerint az exponenciális növekedési fázis során a riboszomális RNS promoterek a lehetséges

promoteraktivitási maximumon dolgoznak, az operonok "lefedettsége" RNS polimeráz molekulákkal 60-70 %-os. Ugyanakkor a shift-up reguláció ismertetésénél állítottuk, hogy stacioner sejtkultúrából történő kinövesztés (vagy metabolikus shift-up) során a promoterek aktivitása egy kezdeti, rövid overshoot után alacsonyabb értékre esik vissza, és ez az alacsonyabb érték felel meg az exponenciális növekedési szakasz alatt mutatott promoteraktivitásnak. De hogyan kaphatunk a "maximális" promoteraktivitásnál nagyobbat az overshoot alatt? És hogyan mutathat ennél még magasabb aktivitásértéket a 6/23-as promoter, melynek működését sem a shift-up szabályozás feltételezett represszora, sem a promoterinterferencia nem fékezi. Vagyis maximum-e a maximum?

Hogy a 6/23-as promoter aktivitása valóban nagyobb a kromoszomális rRNS promotereknél, az igen valószínű a 13. ábra alapján is. Rövid ideig tartó pulzusjelölés során látszólag a beépült radioaktivitás több mint 90 %-a a 6/23-as promoterről szintetizálódó m-RNS-ben van, a stabil RNS-ek (16S és 23S) alig jelölődnek. Az aktivitáskülönbség valójában nem ennyire extrém, ugyanis egyrészt a 6/23-as promoter a 20-25 plazmidkópia következtében 2-2,5-szeres dózisban van jelen a sejtben a kromoszomális rRNS promoterekhez képest, másrészt minél rövidebb ideig tart egy pulzusjelölés, annál inkább eltolódik az arány a rövidebb RNS-ek jelölődése irányába. Ennek megfelelően az 5S riboszomális RNS-ben (amely a 13. ábrán látható gélből már kifutott) valóban nagyobb radioaktivitás található, ez azonban a lényeget döntően nem befolyásolja.

Fel kell tételeznünk - az irodalmi adatokkal némiképp ellentmondásban -, hogy a kromoszomális rRNS operonok közel maximális lefedettsége az RNS polimeráz molekulák által, nem jelent egyben maximális átírási sebességet. Vagyis a 6/23-as promoteren a transzkripció iniciációja ("kezdeményezése") gyakrabban következik be, mint a kromoszomális promotereken. Az alternativ magyarázat szerint a pER23 plazmiddal transzformált

sejtekben kompetició van a plazmidon, illetve a kromoszómán lévő promotereken folyó transzripció között. Vagyis a 6/23-as promoterről induló transzkripció a kromoszomális rRNS szintézis rovására ennyire erős. Elképzelhető bonyolultabb összefüggés is. Például a pER23 plazmiddal transzformált sejt az alfa-peptid túltermelés miatt (a következő fejezetben tárgyaltaknak megfelelően) a normál sejtnél jóval lassabban osztódik, ezért a növekedési ráta kontrol a kromoszomális rRNS szintézist lassítja.

Elmondhatjuk tehát, hogy aránylag könnyű magyarázatot lelnünk arra, miképpen lehet egyazon sejtben aktivabb a plazmidon lévő 6/23-as promoter a kromoszómán lévő "társainál".

Ennél sokkal nehezebb választ kapnunk arra a kérdésre, hogyan lehet az egyik sejtben jóval aktivabb a 6/23 -Nsi és főképpen a 6/23 consensus promoter egy másik sejtben lévő 6/23-as promoternél ha már az is az össz RNS szintézis túlnyomó részét szolgáltatja? Kompetició természetesen ebben az esetben szóba sem jöhet. A pER23 consensus plazmiddal traszformált sejtben mért 3-szoros alfa-peptid aktivitás a pER23 plazmidot hordozó sejthez képest csak egyféleképpen magyarázható. (Megengedhető ugyan, hogy az alfa-peptid aktivitás nem változik lineárisan a m-RNS szinthez képest - például egy bizonyos koncentráció elérése után inclusion-body képződés indul be /lásd a következő fejezetet/ és ez megvédi a fehérjét a degradációtól -ez azonban a képet nem változtatja meg számottevően). Fel kell tételeznünk, hogy az első esetben a sejtben több RNS keletkezik, vagyis - nyilvánvalóan egyéb szintetikus folyamatok rovására - az össz RNS szintézis rátája is nő. Ez az állítás azonban még kísérletes bizonyításra szorul.

6.3. Expressziós vektorok

A jelen - és a következő - fejezetben eredményeink gyakorlati célú felhasználásáról lesz szó. Ezért a diszkusszió során a hangsúlyt elsősorban az alkalmazással összefüggő kérdésekre fektetem és megkísérlek útmutatót adni a potenciális felhasználóknak.

Expressziós vektorrendszerünk sokoldalú felhasználhatóságát számos példával bizonyítottuk. Fel kell azonban hívnom a figyelmet néhány szempontra, melyekre a felhasználóknak feltétlenül tekintettel kell lenniük. Mint már az eredményeink leírásánál megemlítettem, expressziós vektoraink - a beépített idegen gén jellegzetességeitől (a gén mérete, a géntermék toxicitása, stb.) föggő mértékben instabilak a sejtekben, ha a promoter nincs represszálva. Mindez nem meglepő, ha a promoterek rendkívüli erősségére gondolunk, ugyanakkor a nem kívánt következmények kellő körültekintéssel kivédhetők. Korábban már említettem, hogy vektorainkat csak $lacI^q$ genetikai markert hordozó gazdatörzsben tarthatjuk fent, ellenkező esetben ugyanis a promoter nem teljes mértékben represszált. Így vagy JM törzseket kell használnunk (illetve bármilyen olyan E. coli törzset, amelyben a JM törzsekre jellemző F' megtalálható), vagy alternativ megoldásként a $lacI^q$ gént egy kompatibilis plazmidon kell előzetesen a sejtbe bejuttatnunk. Ipari méretű felhasználás során - ahol a fermentáció speciális gazdatörzsekben történik - elsősorban a második lehetőség jön szóba. Kísérleteinkben a pVH1 elnevezésű kanamicin rezisztens plazmidot (Günthert és mtsai 1986) használtuk. Ugyancsak a stabilitással összefüggő probléma, hogy az expresszió optimalizálása szempontjából egyáltalán nem lényegtelen az indukció időpontja. IPTG használata esetén a legnagyobb mértékű expressziót akkor kapjuk, ha a sejtkulturát 0.3-0.4 OD_{550} értéknek megfelelő sejtsűrűségnél indukáljuk. Amennyiben IPTG már a leoltáskor is van a táptalajban, általában a kimutathatóság szintje alatt marad az idegen fehérje

koncentrációja. Ezekben az esetekben valószínűleg mutációk lépnek fel, amelyek tönkreteszik az expressziós vektorplazmid promoterét és ezáltal adaptiv értékűek a sejt számára (lásd 5.5. fejezet). Tapasztalati tény, hogy ilyen mutációk jóval ritkábban jelentkeznek (ill. alternativ magyarázatként a mutáns sejteknek nincs idejük túlnőni társaikat), ha az indukció a már említett sejtsűrűség elérésekor következik be. Több adat utal arra, hogy mutációk valóban gyakrabban keletkeznek, ha a stacioner fázisból történő kinövesztés alatt a promoterek már indukált állapotban vannak. A jelenség valószínű magyarázata, hogy a sejt számára jóval nagyobb "stresszt" jelent, ha a transzkripciós (és transzlációs) mechanizmus olyankor van nagymértékben leterhelve, amikor a fehérjeszintetizáló apparátus mihamarabbi kiépítése a "cél" (lásd shift-up reguláció, 5.1.7. fejezet).
Ezzel szemben a túltermelés jóval könnyebben elviselhető, amikor már az egész riboszomális apparátus rendelkezésre áll. (A kérdésre a 6.5. fejezetben még visszatérek).

Laktózzal végezve az indukciót - az ipari méretű fermentáció során az IPTG nem jöhet szóba költséges volta miatt - ilyen különbséget nem tapasztaltunk, ellenkezőleg, akkor kaptuk a legnagyobb expressziót, ha a laktóz kezdettől fogva a táptalajban volt. A laktóz katabolizmus ismeretében azonban az ellentmondás csak látszólagos. A laktózból ugyanis az első lépésben - enzimatikus hasításra - allolaktóz keletkezik, amely molekula a tulajdonképpeni induktor. Az allolaktóz viszont kellő mennyiségben hozzávetőlegesen addigra halmozódik fel, mikorra a sejtsűrűség az említett 0.3-0.4 OD_{550} értéket már eléri.
Felmerül a kérdés, hogyan "állják a versenyt" vektoraink a kereskedelmi forgalomban kapható egyéb E. coli expressziós vektorplazmidokkal. Egy kiragadott szempont, a promotererősség vonatkozásában az 5.2.3. fejezetben bemutatott összehasonlítás egyértelműen mutatja, hogy a 6/23-as promoter erősebb a pKK223-3 plazmid tac promoterénél.

Brosius és Holy (1984)-ben leírtak egy expressziós vektort,

amely - a mi plazmidjainkhoz hasonlóan - lac operátor szekvenciával regulálhatóvá tett rrnB p2 promoteren alapul. Az ő rendszerükben azonban a promoter gyengébbnek bizonyult a tac promoternél és represszált állapotban is mutatott bizonyos mértékű "átfolyást" (read through). A promoter indukált és represszált állapotban mért aktivitásának aránya nálunk csak 30:1 volt, szemben a 6/23-as promoter egy nagyságrenddel nagyobb (minimálisan 300:1) értékével. Mindkét eltérés aránylag egyszerűen magyarázható. Brosius-ék plazmidján a p2 promotert megelőző rrnB eredetű upstream DNS szakasz jóval rövidebb, így, valószínűleg legfeljebb részben tartalmazza az általunk felismert UAS-t (5.2.5. fejezet). A 6/23-as plazmid hatékonyabb represszió ja azzal a körülménnyel függhet össze, hogy a lac operátor szekvencia a promoter -10-es boxától nukleotidra ugyanolyan távolságra található, mint az eredeti lac promoter esetében. Ezzel szemben a Brosius féle plazmidon ez a távolság jóval nagyobb (ismeretes az irodalomból, hogy a lac operátor szekvencia által megvalósított represszió hatásfoka bizonyos mértékben poziciófüggő (Amouyal és mtsai 1989).

Két rövid kiegészítést kell még tennem, amelyek az expressziós rendszerünk felhasználásával "gyártott" fehérjék tisztítását, ill. későbbi feldolgozását (downstream processing) érintik.

A pER23TA vektorplazmidról (5.3.5. fejezet) szintetizálódó fehérjék olyan fúziós peptidek, amelyek az idegen fehérjét közvetlenül megelőzően egymás után 7-threonin aminosavat tartalmaznak. Ez nyilvánvalóan olyan szerkezeti jellegzetesség, amely a természetes fehérjék esetében sohasem fordul elő, így a fúziós peptid kiválasztható közülük, az erre a szerkezeti elemre specifikus immunszorbens affinitáskromatográfiás oszlop felhasználásával. Vagyis, ha megfelelő antitest áll a rendelkezésünkre, lehetséges, hogy egy lépésben tudjuk a fehérjénket tisztítani. Ilyen monoklonális antitest előállítására megtörténtek az előkészületek az EGIS Hőgyes Endre utcai

laboratóriumában. (Hozzá kell tennem, hogy a probléma megoldását megnehezíti -a hidrofób aminosavakat nagyobb részben tartalmazó idegen fehérjék esetében- ún. zárványtestek (inclusion body) keletkezése a sejtben. Az inclusion body-t alkotó fehérjék újbóli oldatba vitele sokszor csak igen drasztikus eszközökkel (pl. 7M urea) lehetséges. Ilyen körülmények között természetesen az antitest nem működik. Kíméletesebb módszerek (pl. nem ionos detergensek) alkalmazására jelenleg is folynak kísérletek a Kőbányai Gyógyszerárugyár Mikrobiológiai Intézetében.

A fúziós fehérjékről - a homogenitásig történő tisztítás után - még le kell választani a bakteriális eredetű N-terminális részt. Amennyiben az idegen gén tartalmazza a saját transzlációs startkodonját (ATG) - vagy a klónozás során a ClaI linker ATG kodonja kerül alkalmas pozicióba (pl. a pER23TA plazmid használata esetén) - valamint a génben további ATG kodon nincsen, akkor megoldást jelenthet az általánosan alkalmazott BrCN-os hasítási eljárás. A BrCN az ATG kodon által kódolt metionin aminosav karboxil csoportja mellett hasít.

Elméleti lehetőség van arra is, hogy a jövőben fúziós vektorainkba beépítsünk egy olyan rövid DNS darabot, amely valamelyik specifikus proteáz (pl. bizonyos vírus proteázok) hasítóhelyének megfelelő aminosavakat kódolja. Hasonló megoldások képezik egyes biotechnológiai szabadalmak alapjait. Esetükben a tisztított fúziós peptidről a specifikus proteáz eltávolítja a fölösleges N-terminális darabot.

6.4. Plazmidstabilitás

Az előző fejezethez hasonlóan most is az általunk kifejlesztett eljárás gyakorlati felhasználásáról, különböző alkalmazási lehetőségeiről, valamint arról szeretnék szólni, hogy milyen szempontokra kell tekintettel lenniük a lehetséges felhasználóknak. Az 5.4. fejezetben arra vonatkozóan mutattam be példát, miként lehet egy alkalmasan konstruált plazmidot

stabilizálni tetszőleges gazdatörzsben, illetve hogyan lehet kényelmesen szelektálni a - stabilizációhoz vezető - kettős homológ rekombinációs eseményen átesett sejteket, akár 10^9 normál sejt közül. A módszer azonban számos egyéb felhasználási lehetőséget is kínál:

1.) Az eljárás alkalmazásával tetszőleges DNS darabot juttathatunk be a baktérium kromoszómára (vagy helyesebben egy adott kromoszomális target génbe) a homológ rekombináció segítségével. Ebben az esetben az inszertálni kívánt DNS darabot a "T" terminátorral kapcsoltan kell a modellábrán (23. ábra) "A"-val jelölt génbe klónozni. (Elvégeztünk egy - itt részleteiben nem ismertetett - bizonyító kísérletet, ahol a pER23L1CAT plazmid (5.4.3. fejezet) Bgl II helyére a T1T2 terminátor fragmentummal együtt, azt megelőzően egy 1800 bp hosszúságú DNS fragmentumot építettünk be, amely a Tn5 transzpozonból származott, és a kanamicin rezisztencia gént hordozta. A szelektált kettős rekombinánsok kromoszomálisan kódolt kanamicin rezisztenciát mutattak.)

2.) Az eljárás természetesen alkalmazható abban az esetben is, ha az "A" gén nem eszenciális. Ekkor azonban semmi akadálya nincsen - a kettős rekombinációt követően - a plazmid elvesztésének, amennyiben nem alkalmazunk antibiotikum szelekciót. Így a módszer tetszőleges kromoszomális gén inaktiválására is alkalmas, valamint adott esetben annak eldöntésére, hogy az "A" gén létfontosságú-e vagy sem. (Amennyiben nem, akkor a sejt "rábírható" a plazmidja elvesztésére.)

3.) Tetszőleges kromoszomális gént szabályozhatóvá tehetünk a módszer segítségével. A cél érdekében először a target génnek a plazmidon klónozott - és előzetesen inaktivált - kópiáját ("A/1, T, A/2") kell a kívánt kontrol alá helyezni -pl. a lac operátor szekvencia segítségével-, majd mikor a kettős rekombináció során a kicserélődés megtörtént, a korábban kromoszomális kópia válik a plazmidon regulálttá, és a másik (eredetileg plazmid-kódolt) kópia marad a kromoszómán inaktiv.

4.) Ugyancsak lehetőség nyílik az elgondolás felhasználásával a kromoszomális "A" génben keletkezett - spontán vagy indukált - és funkcióváltozás alapján azonosított mutációk gyors jellemzésére, hiszen a rekombinánsokban az érintett génszakasz a plazmidon "könnyen hozzáférhető" helyre kerül és a DNS nukleotidsorrendje kőzvetlenül meghatározható.

5.) Eljárásunk alkalmas tesztrendszert kínál a homológ rekombináció tanulmányozásához is. A rekombinációs frekvenciának a körülményektől függő változásait rendkívül egyszerűen detektálhatjuk.

A módszer elvben adaptálható eukarióta rendszerre is. Ebben az esetben azonban az "A" gén és az "R1" rezisztencia gén fúziója szükséges, ugyanis eukariótákban a "klasszikus" bakteriális típusú operonok működésére csak kevés példa ismert.

Az előnyök és lehetőségek mellett az eljárásnak számos korlátja is akad. Ezek közül néhány egészen nyilvánvaló:

Természetesen a gazdatörzsnek rekombinációra képesnek, vagyis rec+ törzsnek kell lennie.

A terminátor fragmentum inszerciójával két részre osztott "A" gén mindkét fele (A/1 és A/2) legalább 400-500 bp hosszúságú kell hogy legyen, hogy a homológ rekombináció számottevő gyakorisággal bekövetkezzen.

Ugyanilyen magától értetődő, hogy - létfontosságú gén esetén - a génnek ún. transz-ható (transz-acting) elemnek kell lennie, vagyis a plazmidon is ki kell tudni fejtenie a hatását.

Vigyázni kell a konstrukció megtervezésénél az ún. polár hatásra. Nem lehet az "A" gén a kromoszómán egy operon első tagja, amennyiben az operon második (vagy további) tagja is eszenciális. Ekkor ugyanis a kromoszómán - a rekombináció következtében - az egész operon inaktiválódik és a plazmidon lévő működőképes "A" gén egyedül nem képes komplementálni.

Elvben a rezisztens kolóniák lehetnek egyszeres rekombinánsok is, melyekben az egész plazmid integrálódott a kromoszómába. A kettős homológ rekombináció ugyanis két lépésben történik, vagyis

intermedierként szükségképpen egyszeres rekombinánsok keletkeznek. Úgy tűnik azonban, hogy ez csak rövid átmeneti állapot és a második rekombináció (vagy alternativ lehetőségként a plazmid kiválása a kromoszómáról) gyorsan bekövetkezik, ugyanis ilyen egyszeres rekombinánsokat sohasem találtunk.
Ugyancsak elgondolkodtató, hogy lévén az exponenciális növekedési fázisban a baktérium kromoszómája is - különösen a replikációs origóhoz közeli gének esetében - több kópiában van jelen a sejtben, így elméletileg elképzelhető, hogy olyan kolóniák is keletkeznek, amelyek rezisztensek ugyan az R1 antibiotikumra, mert a rekombináció bekövetkezett, de a rekombináns plazmid olyan utódsejtbe került, amelyben a kromoszómán épen maradt az "A" gén. Ilyen "ál-rekombinánsokat" azonban a mi rendszerünkben eddig még nem találtunk.

Az 5.4.3. fejezetben említettem, hogy a pER23L1TTCAT plazmid létrehozása során - az utolsó lépésben - mindig kettő vagy több terminátor fragmentumot tartalmazó plazmidokat találtunk a kloramfenikol szenzitív klónokban. Ugyanakkor a kloramfenikol rezisztens transzformánsok közül néhány tucatból plazmidot preparálva, több olyan akadt köztük, amelyben egy példányban jelen volt a terminátor fragmentum. Úgy tűnik tehát, hogy az adott esetben egy fragmentum nem képes hatékony transzkripciós terminációt megvalósítani, annak ellenére, hogy a fragmentumon már eleve két (rrnB T1 és T2) terminátor van és az rrnB terminátorokról az irodalmi adatok alapján joggal feltételezhettük, hogy a transzkripciót maradéktalanul leállítják. A jelenség valószínű magyarázata az az újabban felismert tény, hogy a rho-independens (és nemkülönben a rho-dependens) terminátorok hatékonyságát nagymértékben csökkenti, ha transzláció folyik rajtuk keresztül (Wright és Hayward 1987). A dupla fragmentum beépülésekor az első fragmentum végén - az L1 génnek megfelelő leolvasási fázisban -egy transzlációs stop kodon található, így a második fragmentumon lévő terminátorok már akadálytalanuk "dolgozhatnak". A probléma általános megoldását az

jelentheti, ha a terminátor fragmentum elé közvetlenül beépítünk egy rövid szintetikus oligonukleotidot, amely mindhárom leolvasási fázisban tartalmaz transzlációs stop kodonokat.

Részletesebben kell foglalkoznom a back-rekombináció problémájával, vagyis azzal a lehetőséggel, hogy - lévén a homológ rekombináció bekövetkezte reverzibilis - a rekombináns (rezisztens) klónokban a kromoszómán visszaalakulhat az eredeti állapot. Ha ez megtörténik, a stabilizált plazmid újból elveszthetővé válik a sejt számára. Az expressziós vektorplazmidok stabilizálásakor ez a lehetőség nem jelent tényleges hátrányt, mert - feltételezve, hogy a back-rekombináció gyakorisága sem nagyobb a már említett 10^{-5} értéknél sejtgenerációnként -a fermentáció során a back-rekombináción átesett és azt követően plazmidjukat elvesztett sejteknek nem marad idejük a társaik túlnövésére. Van azonban eljárásunknak olyan lehetséges felhasználási területe (pl. a kromoszomális géneknek a 3. pontban említett szabályozhatóvá tétele), ahol a back-rekombináció már komoly problémákat okozhat. A probléma áthidalására két megoldás kínálkozik. A 23. ábra nomenklatúráját használva a "T" terminátor fragmentumot az "A" gén legelejére is beépíthetjük. Ebben az esetben természetesen csak akkor következhet be a rekombináció, ha a plazmidon az "A" géntől upstream még egy hosszabb DNS szakasz homológ a kromoszóma megfelelő régiójával. A rekombináns szelekció után a sejt felültranszformálható egy inkompatibilis plazmiddal, amely szintén hordozza az "A" gént -megfelelő transzkripciós kontrollszekvenciák által regulálhatóvá tett formában- ugyanakkor az említett upstream homológ DNS szakasz hiányzik róla. Erre a második plazmidra szelektálva, a sejtben a két plazmid kicserélődése után a back-rekombináció lehetetlenné válik. Alternativ lehetőségként, ha a második ("kergető") plazmid az "A" génnek egy szintetikus kópiáját hordozza, amely a természetestől a lehetséges legnagyobb mértékben eltérő kodonhasználattal bír, akkor nem szükséges, hogy az első ("rekombináltató") plazmid

szerkezete a 23. ábrán bemutatottól eltérjen. Ekkor ugyanis az "A" gén szintetikus és természetes kópiája között oly kismértékű a homológia, hogy a back-rekombináció bekövetkezése valószínűtlen.

A következő fejezetben részletesen foglalkozom azzal a jelenséggel, hogy a túltermelő sejtekben az expressziós vektorplazmidok promoter régiójában gyakran következnek be ún. promoter down mutációk, melyeknek következtében a sejt beszünteti az idegen fehérje termelését. Vagyis a plazmid stabilizálása ellenére - hosszú fermentáció alatt - a tenyészetben felszaporodnak a nem-termelő sejtek. Mindez természetesen nem történne meg, ha az expressziós vektorplazmid promoteréről az idegen génen kívül egy létfontosságú bakteriális gén is átíródna és ugyanakkor ennek a génnek a kromoszómán lévő kópiája nem működőképes. Ekkor ugyanis - az eddigieknek megfelelően - a rekombinánsokban a promoter funkció elvesztése végzetessé válik a sejt számára.

A probléma kézenfekvő megoldásának tűnik, hogy a "stabilizációs operont" az "expressziós kazetta" részévé kell tennünk, vagyis ugyanaz a promoter vezérelje az idegen gén és az "A" gén átírását. Az elképzelés megvalósításának azonban két komoly akadálya is van. Egyrészt a két további fehérje ("A" illetve "R1") szintézise csak a "hasznos" fehérje termelésének rovására történhet. Másrészt az egész plazmidstabilizálási procedúra alatt a promoternek indukált állapotban kellene lennie, hogy a rekombináns sejtben a plazmidon az "A" létfontosságú gén és az "R1" gén kifejeződhessen. Ekkor azonban - az 5.5. fejezetben bemutatott adatoknak megfelelően - a plazmidon nagy számban halmozódnak fel mutációk. Szerencsére az akadályok leküzdésének megvan az elvi lehetősége.

Mint már korábban említettem, a rekombinánsok szelektálásához nem szükséges ugyanazt a plazmidot használnunk, mint amelyet stabilizálni akarunk. A "rekombináltató" plazmid később kicserélhető egy inkompatibilis "kergető" plazmiddal. Ismeretes,

hogy léteznek olyan gének, melyek csak bizonyos körülmények között jelentenek komoly adaptív előnyt a sejt számára. Például a citokrómok jelenléte vagy hiánya anaerob környezetben nem jelent különbséget, ugyanakkor ha a sejttenyészetet intenzíven levegőztetjük, akkor a működőképes citokrómokkal rendelkező - oxidatív foszforilációra képes - sejtek igen jelentős előnyt élveznek, valamelyik citokróm fehérjére deficiens társaikkal szemben. Az elmondottakat felhasználva - ha "A" génnek például a citokróm oxidáz enzimkomplex valamelyik alegységének génjét (pl. cydA, Green és mtsai 1986) választjuk - a "rekombináltató" plazmid segítségével létrehozhatunk kromoszómálisan cydA minusz sejteket. A következő lépésben - a plazmidcserét anaerob körülmények között végezve - a rekombináns sejtbe be tudjuk juttatni a "kergető" plazmidot, amely az expressziós kazetta részeként a működőképes cydA gént kell hogy tartalmazza a saját promotere nélkül. A géntermékre ekkor nincs szükség, így az indukálható promoter maradhat represszált állapotban. Ha a plazmidcsere megtörtént, O2 jelenlétében az indukált promoter down mutációja nem szelekciós előnyt, éppen ellenkezőleg, hátrányt jelent a sejt számára, így az ilyen mutáns nem növi túl az expresszióra képes társait.

Ugyancsak a problémák között említettem, hogy a plusz fehérje - jelen esetben a citokróm d terminális oxidáz I-es alegysége - nagymértékű túltermeltetése az idegen fehérje termelésének rovására történne. Az operon két tagja azonban fehérjeszinten nem szükségszerűen szintetizálódik ekvimoláris mennyiségben. Például az ideálistól nagymértékben eltérő Shine-Dalgarno szekvenciával elérhető, hogy a cydA gén által kódolt fehérjéből csak annyi keletkezzen, amennyi a sejt optimális működéséhez szükséges.

Mindez a lehetőség egyelőre csak elméletben létezik. A megvalósíthatóságot bizonyító kísérletek még hátra vannak.

6.5. Mutációs ráta fokozódás

Lúria és Delbrück (1943) klasszikus kísérletükben a T1 bakteriofágra rezisztens E. coli sejtek előfordulási gyakoriságát vizsgálták és azt találták, hogy a T1 fág jelenléte - vagyis az erős szelekciós nyomás a rezisztens klónok megjelenésére vonatkozóan - semmivel sem fokozta a mutáció gyakoriságát. Az irodalmi összefoglalóban (2.8.1. fejezet) már említett kísérletük lényege az volt, hogy nagyszámú, független sejtkultúrából származó mintákat szélesztettek T1 fágot tartalmazó YTA lemezekre és a megjelenő fágrezisztens kolóniák számát tesztelték. Munkahipotézisük szerint, amennyiben a mutációk a fág jelenléte következtében, vagyis szelekciós nyomásra jelentkeznek, akkor a különböző lemezeken kinövő fágrezisztens klónok gyakorisága Poisson eloszlást kell hogy mutasson. Ebben az esetben ugyanis a rezisztens klónok számát egyedül annak a valószínűsége szabja meg, hogy egy adott sejtben milyen eséllyel következik be az adaptiv mutáció, mielőtt a sejt elpusztulna a fág támadása által. Ellenkező esetben viszont, ha a fágrezisztens sejtek nem a szelekciós nyomás hatására keletkeznek, hanem már korábban jelen vannak a sejtkultúrában, egy spontán és random mutációs folyamat eredményeképpen, akkor a gyakoriság rendkívül nagy statisztikus ingadozást kell hogy mutasson, attól függően, hogy egy adott kultúrában keletkezett-e véletlenül ilyen sejt, vagy nem. Kísérleti elrendezésükben egyértelműen a második lehetőség igazolódott be, így a random, nem adaptiv mutációs mechanizmus mellett törtek lándzsát. Eredményeikből indirekt módon az is következik, hogy szelekciós nyomás hatására - legalábbis ilyen kísérleti körülmények között - a spontán mutációs gyakoriság sem nő meg.

Cairns és mtsai (1988) nagy port kavart közleményükben vitatták Lúriáék állítását, arra hivatkozva, hogy a fágrezisztencia kifejeződéséhez - a DNS szekvenciában bekövetkezett változás pillanatától kezdődően - bizonyítottan

több sejtgenerációnyi időnek kell eltelni (Hayes 1964), addigra azonban a fág már elpusztítja a sejteket. Így nincs esélye az adaptiv mutáció megnyilvánulásának. Cairns-ék több kísérletet végeztek, amelynek eredményeképpen állítják, hogy az adaptiv mutációk valójában jóval nagyobb gyakorisággal jelentkeznek, mint a spontán mutációs ráta alapján várható volna. Kísérleteik egy részében laktóz felhasználására képtelen (lac^-) sejteket szélesztettek laktózmentes táptalajra és nagy számban kaptak (lac^+) revertánsokat. Ezek a revertánsok a szélesztés után több nappal jelentek meg, vagyis nem voltak eleve jelen a sejtszuszpenzióban, hanem a szelekciós nyomás hatására keletkeztek.

Cairns állítása szerint tehát, amennyiben a sejteknek - a Lúria féle kísérlettől eltérően - lehetőségük és idejük van arra, hogy "szorult" helyezetükből kiutat találjanak, akkor élnek ezzel a lehetőséggel és adaptiv mutácókkal valamiféle ön-génsebészetet hajtanak végre magukon. Cairns megvizsgálta ugyanakkor a független génekben bekövetkező mutációk gyakoriságát - példának a valin rezisztencia megjelenését vette - és azt találta, hogy a valin rezisztens klónok száma semmivel sem nőtt meg a kontrollhoz képest. Vagyis látszólag a sejtek valamilyen módon választani tudnak, hogy melyik mutációra van szükségük és melyikre nincs. Cairns az ilyen adaptiv mutációt irányított (directed) mutációnak nevezte. Mindez a neo-darwini evolúciós elmélet szempontjából valóságos szentségtörésnek számított, de Cairns "még tovább" ment. Diszkutált egy lehetséges mechanizmust, amelynek alapján a sejt a számára kedvező mutációkat meg tudja őrizni.

Elméletét két axiómára alapozva dolgozta ki. Egyfelöl - minthogy kísérleti rendszerében deficiens (pl. lac^-) sejteket inkubált olyan körülmények között (laktózmentes táptalajon), amelyek az adaptiv mutáció bekövetkezte előtt nem tették lehetővé a sejtek osztódását - úgy gondolta, hogy a directed mutáció létrejötte nem feltételezheti az előzetes DNS replikációt. Másrészt régtől fogva ismert tény, hogy az RNS transzkripció

során 5-6 nagyságrenddel nagyobb gyakorisággal fordul elő hibás nukleotidok beépülése, mint a DNS replikáció esetében. (A transzkripció alatt ugyanis semmilyen repair mechanizmus sem ellenőrzi az átírás "hűségét") (Reanney 1984). Így Cairns feltételezte, hogy a directed mutácó létrejöttének első lépése egy olyan m-RNS molekula keletkezése, amely már hordozza a "kívánt mutációt". A következő lépésben a sejt valamilyen módon ellenőrizni képes, hogy a - számára a megoldást jelentő - fehérje molekula melyik m-RNS-ről szintetizálódott (!) és egy feltételezett reverz transzkripciós mechanizmus segítségével, az erről az m-RNS-ről készült c-DNS kópiával helyettesíti az eredeti gént. Vagyis Cairns - annak feltételezése mellett, hogy a reverz transzkripció és a génkonverziós mechanizmus a prokariótákban is megtalálható - információáramlást tart lehetségesnek a fehérjétől az RNS irányába. Ezzel a "centrális dogma" - mely szerint a DNS-ben kódolt információ fejeződik ki a m-RNS-en keresztül a fehérje aminosavszerkezetében és sohasem fordítva - utolsó, eddig még állva maradt bástyája is meginog.

B.G. Hall (1990) megkísérelte menteni a menthetőt. Ő is igazolta ugyan a directed mutációk létezésének tényét - Cairns-éhoz hasonló kísérleti rendszerében meggyőzően bizonyította, hogy trp^-, cys^- kettős auxotróf E. coli sejtkultura triptofán mentes, de cysteint tartalmazó táptalajon csak trp^+ revertánsokat, a fordított esetben viszont csak cys^- revertánsokat adott nagy gyakorisággal, és ezzel párhuzamosan a valin rezisztens sejtek aránya egyik esetben sem nőtt meg - feltételezte azonban, hogy ez csak a kísérleti elrendezés következménye. Hipotézise szerint a "fiziológai stressz" körülményei közé került sejtek egy hányadában intenziv DNS degradációs folyamatok lépnek fel (hipermutábilis állapot), ami a hibára hajlamos (error-prone) repair mechanizmus működését indukálja. A továbbiakban két eset lehetséges. Vagy hamarosan bekövetkezik az adott körülmények között a sejt számára adaptiv mutáció, ebben az esetben a sejt túlél és hordozza az adaptiv (és az addig keletkezett összes

többi) mutációt, vagy a sejt elpusztul a DNS-e teljes degradációja következtében. Vagyis a független mutációk előfordulása szempontjából tesztelt sejtek csak azok lehetnek, amelyek nem estek át a hipermutábilis állapoton. Így Cairns, aki azzal "vádolta" Lúriát, hogy nem adta meg a sejteknek az esélyt, hogy rezisztenssé váljanak a T1 fág fertőzésével szemben, semmivel sem bizonyult a colit illetően "lovagiasabbnak". Az ő kísérleti elrendezésében viszont azoknak a sejteknek nem volt túlélési esélye, amelyek csak a nem-szelektált, független markerekben halmoztak fel mutációkat. Hall - állítását bizonyítandó - példákat hozott fel, amelyek igazolják, hogy az adaptiv mutációkat hordozó, vagyis a feltételezett hipermutábilis állapoton már átesett sejtekben ténylegesen megnőtt a független mutációk gyakorisága. Stahl (1988) leírta, hogy a hasonló szelekciós körülmények mellett kapott trp^+ revertáns klónok között 600-szor több különféle auxotrófot talált, mint amennyi várható lett volna, ha feltételezzük, hogy a két mutációs esemény egymástól függetlenül következett be. Ugyanerre utal több megfigyelés, mikor a mutáns sejtekben további, a környezethez való adaptáció szempontjából közömbös változásokat találtak a DNS szekvenciában (Hall 1982, Hall és mtsai 1989).

Az 5.5. fejezetben ismertetett kísérletek nyomán kirajzolódó kép szerint, az idegen fehérjét túltermelő E. coli sejtekben - amennyiben a túltermelés a sejt növekedési rátájának a csökkenését okozza - a mutációk gyakorisága több mint egy nagyságrenddel megnő. Ez a mutációs ráta fokozódás adaptiv és nem adaptiv mutációk esetében egyaránt igaz, vagyis nemcsak a promoter down mutációk bekövetkezésének az esélye nő meg (amelyek felszabadítják a sejtet az expresszió "megterhelő kötelességének" teljesítése alól), hanem a független gének neutrális mutációinak gyakorisága is emelkedik. Úgy tűnik tehát, hogy megtaláltuk azt a kísérleti rendszert, amely direkt bizonyítékot szolgáltat, hogy a sejtekre ható "stressz" bizonyos formája valóban megnöveli a mutációs frekvenciát a szelektált és a nem szelektált

tulajdonságokat meghatározó génekben egyaránt. A mutációs gyakoriság hasonló, bár kisebb mértékű emelkedését tapasztaltuk anaerob körülmények között, ezért erősen valószínűsíthető, hogy ennél általánosabban, minden olyan "fiziológiai stressz", amely a sejtek lassúbb növekedését okozza, ugyancsak mutációs rátát fokozó tényező. Eredményeink alátámasztják a Hall által elképzelt mechanizmust, azzal a kiegészítéssel, hogy a hipermutábilis állapotot nem kell szükségszerűen "minden vagy semmi" alapon elképzelni. Az expressziós vektorainkat hordozó sejtek indukált állapotban, ha lassan is de osztódnak, ellentétben a Cairns féle kísérleti elrendezéssel, vagyis ez utóbbit felfoghatjuk egy általánosabb jelenség - nulla növekedési rátára extrapolált - határértékének. Minthogy ebben az általános esetben a DNS replikáció nem feltételez előzetes degradációt, igy a hipermutábilis állapot sem szükségképpen letális a sejt számára, abban az esetben sem, ha az adaptiv mutáció nem következik be. Ezért sikerült az összefüggést kimutatnunk.

Röviden szükséges diszkutálni, hogy milyen mechanizmusokon keresztül képzelhető el - a stresszre adott válaszként - a mutabilitás fokozódása. A legvalószínűbb magyarázat - Hall elképzelésével teljes összhangban - a hibára hajlamos javító mechanizmus indukciójának a feltételezése, egy fontos kiegészítéssel. Mint az irodalmi összefoglalóban már utaltam rá, az error-prone repair aktiválódásának első lépése a recA fehérje indukciója. Az azonban nem ismeretes, hogy milyen szignál hatására fokozódik - a sejt DNS-ének károsodásakor - a recA expressziója ? Ha feltételezzük, hogy a recA indukció bekövetkezhet előzetes DNS károsodás nélkül - egyéb "stressz" hatására -, akkor a "közönséges" DNS replikáció során is megnőhet a mutációk gyakorisága a DNS-polimeráz III "átíráshűségének" a lazulása folytán. Bár a recA allél részvételét igazoltuk az általunk felismert jelenségben (5.5.6. fejezet), a direkt ok-okozati összefüggés feltárása még előttünk áll.

Mielőtt tort ülnénk a neo-darwini teória "megvédése" fölötti

örömünkben, el kell gondolkodnunk megfigyelésünk egy lehetséges következményén. Eredményeink bizonyítják, hogy az idegen fehérjét túltermelő E. coli sejtek kromoszomális génjeiben több mint egy nagyságrenddel, a plazmidon kódolt génekben viszont egészen extrém mértékben megnő a spontán mutációs gyakoriság. Ennek következtében a rekombináns fehérje feltehetőleg igen inhomogén, ami (pl. egy peptidhormon esetében) a terápiás felhasználást komolyan megkérdőjelezheti (és újabb támadási felületet nyújt a rekombináns technológia alkalmazása ellen tiltakozó "zöld" mozgalmaknak). Ezzel szembeszegezhető, hogy - az általános hiedelemmel ellentétben - a normál eukarióta és prokarióta sejtben folyó fehérjeszintézis során, a transzkripció már említett igen magas tévedési százalékának következtében ugyancsak sok mutáns fehérje található. Egyrészt azonban ezeknek a hibás fehérjéknek a nagy részét különböző degradativ mechanizmusok gyorsan elbontják, másrészt a kétféle hibaforrás együttes hatásának eredményeként a rekombináns fehérje inhomogenitása meghaladhat egy olyan fokot, amelyen túl már - pl. az előbb említett peptidhormon terápia esetében - komoly élettani hatása lehet a természetestől eltérő fehérjemolekulák jelenlétének.

További kutatást igényel annak eldöntése, hogy $recA^-$ gazdatörzs használatával megakadályozhatjuk-e a hibás fehérjék felhalmozódását ?

7. Összefoglalás

Az Escherichia coli baktérium egyik riboszómális RNS operonjának (az un. rrnB operonnak) a transzkripciós szabályozását vizsgálva egy ujfajta regulációt fedeztünk fel, amely a sejt tápanyagellátottságának a függvényében szabályozza az operon promótereinek az aktivitását. A shift-up regulációnak elnevezett szabályozás - a riboszómális RNS operonok transzkripciójára ható, eddig ismert tényezőktől eltérően - mindkét promóter aktivitását befolyásolja.

Kisérleteket végeztünk a shift-up reguláció pontosabb természetének felderítése érdekében, és a kapott eredmények felhasználásával létrehoztunk egy igen hatékony expressziós vektorcsaládot, amelynek univerzális alkalmazhatóságát széleskörűen bizonyítottuk.

Expressziós vektorainkat tovább tökéletesítettük a promóterek struktúrális és funkciónális sajátságainak tanulmányozása során nyert adatok segítségével.

Kifejlesztettünk egy eljárást, amelynek alkalmazásával az expressziós vektorainkat tetszőleges fermentációs gazdatörzsben tudjuk stabilizálni.

Végezetül a túltermelő baktérium törzseinkkel végzett munka során érdekes megfigyelést tettünk a sejtek spontán mutációs gyakoriságára vonatkozóan. Eredményeinket értékelve egy lehetséges modellt állítottunk fel az un. adaptív mutációk magyarázatára.

Hivatkozások

Aksoy, S., C.L. Squires and C. Squires (1984)
Evidence for antitermination in Escherichia coli rRNA transcription.
J. Bacteriol. 159, 260-264.

Amouyal, M., L. Mortensen, H. Buc and K. Hammer (1989)
Single and double loop formation when deoR repressor binds to its natural operator sites.
Cell 58, 545-551.

Appleyard, R.K. (1954)
Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from Escherichia coli K-12.
Genetics 39, 440-452.

Baker, T.A., A.D. Grossman and G.A. Gross (1984)
A gene regulating the heat shock response in Escherichia coli alsou affects proteolysis.
Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 6779-6783.

Baliko, G., A. Raukas, I. Boros, P. Venetianer (1988)
An Escherichia coli gene in search of a function.
Mol. Gen. Genet. 211, 326-331.

Bauer, B.F., E.G. Kar, R.M. Elford and W. M. Holmes (1988)
Sequence determinants for promoter strenght in the leuV operon of Escherichia coli.
Gene 63, 123-134.

Biebricher, C.K. and M. Druminski (1980)
Inhibition of RNA polymerase activity by the Escherichia coli protein biosynthesis elongation factor Ts.
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 866-869.

Birnboim, H.C. and J. Doly (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucl. Acid. Res. 7, 1513-1523.

Bolivar, F., R.L. Rodrigez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heynecker, H.W. Boyer, J.H. Cross and S. Falkow (1977)
Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.
Gene 2, 95-113.

Borek, E., J. Rockenbach and A. Ryan (1956)
Studies on a mutant of Escherichia coli with unbalanced ribonucleic acid synthesis.
J. Bacteriol. 71, 318-323.

Boros, I., A. kiss and P. Venetianer. (1979)
Physical map of the seven ribosomal RNA genes of Escherichia coli.
Nucl. Acid Res. 6, 1817-1830.

Boros, I., A. Kiss, B. Sain, G. Somlyai and P. Venetianer (1983)
Cloning of the promoters of an Escherichia coli rRNA gene.
New experimental system to study the regulation of rRNA transcription.
Gene 22, 191-201.

Boros, I., T. Lukacsovich, G. Baliko and P. Venetianer (1986)
Expression vectors based on rac fusion promoter.
Gene 42, 97-100.

Bossi, L. and D.M. Smith (1984)
Conformational change in the DNA associated with an unusual promoter mutation in a tRNA operon of Salmonella.
Cell 39, 643-652.

Boyen, A., J. Piette, R. Cunin and N. Glansdor (1982)
Enhancement of translation efficiency in Escherichia coli by mutations in a proximal domain of messenger-RNA.
J. Mol. Biol. 162, 715-720.

Boyer, H.W. and D. Roulland-Dussoix (1969)
A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 41, 459-472.

Bradford, M.M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-264.

Bravo, A., S. Ortega, G. Torrontegui and R. Diaz (1988)
Killing of Escherichia cells modulated by components of the stability system ParD of plasmid R1.
Mol. Gen. Genet. 215, 146-151.

Bremer, H., L. Berry and P.P. Dennis (1973)
Regulation of ribonucleic acid synthesis in Escherichia coli B/r: an analysis of a shift up.
J. Mol. Biol. 75, 161-169.

Bremer, H. and P.P. Dennis (1987)
Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology, ed. Neidhardt, F.C. (Am.Soc.Microbiol., Washington, DC) 1527-1542.

Brosius, J., T.J. Dull, D.D. Sleeter and H. Noller (1981)
Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from E. coli.
J. Mol. Biol. 148, 107-127.

Brosius, J. and A. Holy (1984)
Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6929-6933.

Brunner, M. and H. Bujard (1987)
Promoter recognition and promoter strenght in the Escherichia coli.
EMBO J. 6, 3139-3144.

Cairns, J., J. Overbaugh and S. Miller (1988)
The origins of mutants.
Nature 335, 142-145.

Carter, P., H. Bedouelle és and Winter (1985)
Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors.
Nucl. Acid. Res. 13, 4431-4443.

Cashel, M. and J. Gallant (1969)
Two compounds implicated in the function of the RC gene of Escherichia coli.
Nature 221, 838-841.

Cashel, M. (1975)
Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp.
Ann. Rev. Microbiol. 29, 301-318.

Cashel, M. and K.E. Rudd (1987)
The stringens response in Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology, ed. Neidhardt, F.C. (Am.Soc.Microbiol., Washington, DC) 1410-1438.

Ciampi, M.S., M.B. Schmid and J.R. Roth (1982)
Transposon Tn10 provides a promoter for transcription of adjacent sequences.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 5016-5020.

Cohen, S.N. A.C.Y. Chang and L. Hsu (1972)
Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria:
Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110-2114.

Cole, J.R. and N. Nomura (1986)
Translational regulation is responsible for growth-rate-dependent and stringent control of the synthesis of ribosomal proteins L11 and L1 in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4129-4133.

Covarrubias, L. and F. Bolivar (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.

Csiszar, K., T. Lukacsovich and P. Venetianer (1990)
Regulatory elements downstream of the promoter of an rRNA gene of E. coli.
Biochim and Biophis. Acta 1050, 312-316.

DeBoer, H.A., L.J. Comstock and M. Vasser (1983)
The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters.
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 21-25.

DeBruijn, F.J. and J.R. Lupski (1984)
The use of transposon Tn5 mutagenesis in the rapid generation of correlated physical and genetic maps of DNA segments cloned into multicopy plasmids - a review.
Gene 27, 131-149.

Dennis, P.P. and H. Bremer (1974)
Differential rate of ribosomal protein synthesis in E. coli B/r.
J. Mol. Biol. 84, 407-422.

Dickson, R.R., T. Gaal, H.A. DeBoer, P.L. DeHaseth, and R.L. Gourse (1989/b)
Identification of promoter mutants defective in growth-rate-dependent regulation of rRNA transcription in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 171, 4862-4870.

Dretzen, G., M. Bellard, P. Sassone-Corsi and P. Chambon (1981)
A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels.
Anal. Biochem. 112, 295-298.

Deuschle, U., W. Kammerer, R. Gentz and H. Bujard (1986)
Promoters of Escherichia coli: a hierarchy of in vivo strenght indicates alternate structures.
EMBO J. 5, 2987-2994.

Ellwood, M. and M. Nomura (1980)
Deletion of a ribosomal ribonucleic acid operon in Escherichia coli.
J. Bacteriol 143, 1077-1080.

Ellwood, M. and M. Nomura (1982)
Chromosomal locations of the genes for rRNA in Escherichia coli K-12.
J. Bacteriol 149, 458-468.

Fallon, A.M., C.S. Jinks, G.D. Strycharz and Nomura, M. (1979)
Regulation of ribosomal protein synthesis in Escherichia coli by selective mRNA inactivation.
Proc. Natl. Acad. Ssci. USA 76, 3411-3415.

Feinberg, A.P. and B. Vogelstein (1983)
A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity.
Anal. Biochem. 132, 6-13.

Fiil, N. and J.D. Friesen (1968)
Isolation of "relaxed" mutants of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 95, 729-731.

Gaal,T., J. Barkei, R.R. Dickson, H.A. DeBoer, P.L. DeHaseth, H. Alavi and R.L. Gourse (1989)
Saturation mutagenesis of an Escherichia coli rRNA promoter and initial characterization of promoter variants.
J. Bacteriol. 171, 4852-4861.

Gaal, T. and R.L. Gourse (1990)
Guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate is not required for growth-rate-dependent control of rRNA synthesis in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 5533-5537.

Gallant, J.A. (1979)
Stringent control in E. coli.
Ann. Rev. Genet. 13, 393-415.

Gausing, K. (1977)
Regulation of ribosome production in Escherichia coli:
synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates.
J. Mol. Biol. 115, 335-354.

Gentz, R., Langer, A., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. and Bujard, H. (1981)
Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4936-4940.

Gerdes, K., P.B. Rasmussen and S. Molin (1986)
Unique type of plasmid maintenance function:
Postsegregational killing of plasmid-free cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 3116-3120.

Giam, C.Z. and I. Boros (1988)
In vivo and in vitro autoprocessing of human immunodeficiency virus protease expressed in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 263, 14617-14620.

Glaser, G. and M. Cashel (1979)
In vitro transcripts from the rrnB ribosomal cistron originate from two tandem promoters.
Cell 16, 111-121.

Glaser, G., P. Sarmientos and M. Cashel (1983)
Functional interrelationship between two tandem E. coli ribosomal RNA promoters.
Nature 302, 74-76.

Gold, L., D. Pribnow, T. Schneider, S. Shinedling, B.S. Singer and G. Stormo (1981)
Translational initiation in prokaryotes.
Ann. Rev. Microbiol. 35, 365-403.

Gourse, R.L. and M. Nomura (1984)
Level of rRNA, not tRNA, synthesis controls transcription of rRNA and tRNA genes in Escherichia coli.
J. Bacteriol. 160, 1022-1026.

Gourse, R.L., Y. Takebe, R.A. Sharrock and M. Nomura (1985)
Feedback regulation of rRNA and tRNA synthesis and accumulation of free ribosomes after coditional expression of rRNA genes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1069-1073.

Gourse, R.L., H.A. deBoer and M. Nomura (1986)
DNA determinants of rRNA synthesis in E. coli: Growth rate dependent regulation, feedback inhibition, upstream activation, antitermination.
Cell 44, 197-205.

Green, G.N., R.M. Lorence and R.B. Gennis (1986)
Specific overproduction and purification of the cytochrome b_{558} component of the cytochrome d complex from Escherichia coli.
Biochemistry 25, 2309-2314.

Gupta, R.S. and U.N. Singh (1972)
Biogenesis of ribosomes: free ribosomal protein pools in E. coli.
J. Mol. Biol. 69, 279-301.

Günthert, U., L. Reiners and R. Lauster (1986)
Cloning and expression of Bacillus subtilis phage DNA methyltransferase genes in Escherichia coli and B. subtilis.
Gene 41, 261-270.

Hall, B.G. (1982)
A chromosomal mutation for citrate utilization by Escherichia coli K12.
J. Bacteriol. 152, 269-273.

Hall, B.G., P.W. Betts and J.C. Wootton (1989)
DNA sequence analysis of artificially evolved ebg enzyme and ebg repressor genes.
Genetics 123, 635-648.

Hall, B.G. (1990)
Sponteneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral.
Genetics 126, 5-16.

Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.
J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Harley, C.B. and R.P. Reynolds (1987)
Analysis of E. coli promoter sequences.
Nucl. Acid. Res. 15, 2343-2360.

Hawley, D.K. and McClure, W.R. (1983)
Compilation and analysis of E. coli promoter DNA sequences.
Nucl. Acid. Res. 11, 2237-2255.

Hayes, W. (1964)
The Genetics of Bacteria.
Blackwell, Oxford.

Hodgson, C.P. and R.Z. Fisk (1987)
Hybridization probe size control: optimized "oligolabelling".
Nucl. Acid. Res. 15, 6295.

Holben, W.E. and E.A. Morgan (1984)
Antitermination of transcription from an Escherichia coli ribosomal RNA promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6789-6793.

Holben, W.E., S.M. Prasad and E.A. Morgan (1985)
Antitermination both the promoter and the leader region of an Escherichia coli ribosomal RNA operon.
Proc. Natl. Acad. Sco. USA 82, 5071-5077.

Humpreys, G.O., G.A. Willshaw and E.S. Anderson (1975)
A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA.
Biochem. Biophys. Acta 383, 457-463.

Jaffé, A., T. Ogura and S. Hiraga (1985)
Effects of ccd function of the F plasmid on bacterial growth.
J. Bacteriol. 163, 841-849.

Jinks-Robertson, S., Gourse, R.J. and Nomura, M. (1983)
Expression of rRNA and tRNA genes in Escherichia coli:
Evidence for feedback regulation by products of rRNA operons.
Cell 33, 865-876.

Jinks-Robertson, S. and Nomura M. (1987)
Ribosomes and tRNA in Escherichia coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology, ed. F.C. Neidhard (Am.Soc.Microbiol., Washington,DC) 1358-1385.

Kammerer, W., U. Deuschle, R. Gentz and H. Bujard (1986)
Functional dissection of Escherichia coli promoters:
information in the transcribed region is involved in late steps of the overall process.
EMBO J. 5, 2995-3000.

Kano, Y., T. Miyashita, H. Nakamura, K. Kuroki, A. Nagata and F. Imamoto (1981)
In vivo correlation between DNA supercoiling and transcription.
Gene 13, 173-184.

Kari, C., I. Torok and A. Travers (1977)
ppGpp cycle in Escherichia coli.
Mol. Gen. Genet. 150, 249-255.

Kajitani, M. and A. Ishihama (1983)
Determination of the promoter strenght in the mixed transcription system. II. Promoters of ribosomal RNA, ribosomal protein S1 and RecA protein operons from Escherichia coli.
Nucl. Acid. Res. 11, 3873-3888.

Kiss, A., B. Sain and P. Venetianer (1977)
The number of rRNA genes in Escherichia coli.
FEBS Lett. 79, 77-79.

Klein, R.D., E. Selsing and R.D. Wells (1980)
A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA suitable for restriction enzyme analysis.
Plasmid 3, 88-91.

Koo, H.S., H.M. Wu and D.M. Crothers (1986)
DNA bending at adenine-thymine tracts.
Nature 320, 501-506.

Kramer, H., M. Niemöller, M. Amouyal, B. Revet, B.V. Wilcken-Bergmann and B. Müller-Hill (1987)
Lac repressor form loop with linear DNA carrying two suitable spaced lac operators.
EMBO J. 6, 1481-1491.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.

Lamond, A.I. and A.A. Travers (1983)
Requirement for an upstream element for optimal transcription of a bacterial tRNA gene.
Nature 305, 248-250.

Lazzarini, R.A. and Winslow, R.M. (1970)
The regulation of RNA synthesis during growth rate transition and amino acid deprivation in Escherichia coli.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 383-390.

Lazzarini, R.A., M. Cashel and J. Gallant (1971)
On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 264, 4381-4385.

Li, S.C., C.L. Squires and C. Squires (1984)
Antitermination of E. coli rRNA transcription is caused by a control regio segment containing lambda nut-like sequences.
Cell 38, 851-860.

Lukacsovich, T., I. Boros and P. Venetianer (1987)
New regulatory features of the promoters of an E. coli rRNA gene.
J. Bacteriol. 169, 272-277.

Lukacsovich, T., T. Gaal and P. Venetianer (1989)
The structural basis of the high in vivo strenght of the rRNA P2 promoter of Escherichia coli.
Gene 78, 189-194.

Lukacsovich, T. and P. Venetianer (1989)
A new procedure for targeted inactivation of essential bacterial genes.
Molecular Gene Genetics 218, 364-366.

Lukacsovich, T., G. Baliko, A. Orosz, E. Balla and P. Venetianer (1990/a)
New approaches to increase the expression and stability of cloned foreign genes in Escherichia coli.
J. of Biotech. 13, 243-250.

Lukacsovich, T., A. Orosz, G. Baliko and P. Venetianer (1990/b)
A family of expression vectors based on the rrnB P2 promoter of Escherichia coli.
J. of Biotech. 16, 49-56.

Lukacsovich, T. and P. Venetianer (1991)
Increased mutation rate in bacteria overexpressing a cloned foreign gene.
Mut. Res. in press.

Luria, S.E. and M. Delbrück (1943)
Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance.
Genetics 28, 491-511.

Mandal, N., W. Su, R. Haber, S. Adhya and H. Echols (1990)
DNA looping in cellular repression of transcription of the galactose operon.
Genes Dev. 4, 410-418.

Maniatis, T., A. Jeffrey and H. van de Sande (1975)
Chain lenght determination of small double and single-stranded DNA molecules by poliacrylamide gel electrophoresis.
Biochemistry 14, 3787-3794.

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook (1982)
Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Lab., New York.

Marini, J.C., S.D. Levene, D.M. Crothers and P.T. Englund (1982)
Bent helical structure in kinetoplast DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 7664-7668.

Maxam, A.M. and W. Gilbert (1977)
New method for sequencing DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 560-564.

Maxam, A.M. and W. Gilbert (1980)
Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages.
Meth. Enzymol. 65, 499-560.

McClure, W.R., D.K. Hawley, P. Youderian and M.M. Susskind (1983)
DNA determinants of promoter selectivity in Escherichia coli.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 477-481.

McClure, W.R. (1985)
Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes
Ann. Rev. Biochim. 54, 171-204.

Metzger, S., G. Schreiber, E. Aizenman, M. Cashel and G. Glaser (1989/a)
Protein sequences encoded by the relA and spoT genes of Escherichia coli are interrelated.
J. Biol. Chem. 264, 9122-9125.

Metzger, S., G. Schreiber, E. Aizenman, M. Cashel and G. Glaser (1989/b)
Characterization of the relA1 mutation and a comparison of relA1 and relA null alleles in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 264, 21146-21152.

Miller, J.H. (1972)
Experiments in molecular genetics.
Cold Spring Harbor Laboratories

Mizuno, T. and S. Mizushima (1986)
Characterization by deletion and localized mutagenesis in vitro of the promoter region of the Escherichia coli ompC gene and importance of the upstream DNA domain in positive regulation by the OmpR protein.
J. Bacteriol. 168, 86-95.

Morgan, E.A. (1986)
Antitermination mechanisms in rRNA operons of Escherichia coli.
J. Bacteriol. 168, 1-5.

Mulligan, M.E., D.K. Hawley, R. Entriken and W.R. McClure (1984)
Escherichia coli promoter sequences predict in vitro RNA polymerase selectivity.
Nucl. Acid. Res. 12, 789-800.

Nachaliel, N., J. Melnich, R. Grafny and G. Glaser (1989)
Ribosome associated protein(s) specifically bind(s) to the upstream activator sequence of the E. coli rrnA P1 promoter.
Nucl. Acid. Res. 17, 9811-9822.

Nierlich, D.P. (1978)
Regulation of bacterial growth, RNA, and protein synthesis.
Ann. Rev. Microbiol. 32, 393-432.

Nilsson, L., A. Vanet, E. Vijgenboom and L. Bosch (1990)
The role of FIS in trans activation of stable RNA operons of E. coli.
EMBO J. 9, 727-734.

Nomura, M., E.A. Morgan and S.R. Jaskunas (1977)
Genetics of bacterial ribosomes.
Annu. Rev. Genet. 11, 297-347.

Nomura, M., R.L. Gourse and G. Baughman (1984)
Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components
Annu. Rev. Biochem. 53, 75-117.

Ogura, T. and S. Hiraga (1983/a)
Partition mechanism of F plasmid: Two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition.
Cell 32, 351-360.

Ogura, T. and S. Hiraga (1983/b)
Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation.
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 4784-4788.

Oostra, B.A., G. Ab and M. Gruber (1980)
Involvement of DNA gyrase in the transcription of ribosomal RNA.
Nucl. Acid. Res. 8, 4235-4246.

Pace, N.R. (1973)
Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes.
Bact. Rev. 37, 562-603.

Pato, M.L. and K. von Meyenburg (1970)
Residual RNA synthesis in Escherichia coli after inhibition of initiation of transcription by rifampicin.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 497-504.

Pethő, Á., J. Belter, I. Boros and P. Venetianer (1986)
The role of upstream sequences in determining the strenght of an rRNA promoter of E. coli.
Biochim. et Biophys. Acta 866, 37-43.

Plaskon, R.R. and R.M. Wartel (1987)
Sequence distributions associated with DNA curvature are found upstream of strong E. coli promoters.
Nucl. Acid. Res. 15, 785-796.

Pósfai, G., A. Kiss and P. Venetianer (1986)
Overproduction of the Bacillus sphaericus modification methylase in Escherichia coli, and its purification to homogeneity.
Gene 50, 63-67.

Post, L.E., G.D. Strycharz, M. Nomura, H. Lewis and P.P. Dennis (1979)
Nucleotide sequence of the ribosomal protein gene cluster adjacent to the gene for RNA polymerase subunit beta in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1697-1701.

Reanney, D.C. (1984)
Genetic noise in evolution.
Nature 307, 318-319.

Ross, W., J.F. Thompson, J.T. Newland and R.L. Gourse (1990)
Escherichia coli FIS protein activates ribosomal RNA transcription in vitro and in vivo.
EMBO J. 9, 3733-3742.

Rossi, J.J., X. Soberon, Y. Marumoto, J. McMahon and K. Itakura (1983)
Biological expression of an Escherichia coli consensus sequence promoter and some mutant derivatives.
Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 3203-3207.

Ryals, J., R. Little and H. Bremer (1982)
Control of rRNA and tRNA synthesis in Escherichia coli by guanosine tetraphosphate.
J. Bacteriol. 151, 1261-1268.

Sanger, F., S. Nicklen and AR. Coulson (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.

Sanger, F., A.R. Coulson, B.G. Barrell, A.S.H. Smith and B.A. Roe (1980)
Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing.
J. Mol. Biol. 143, 161-178.

Sarmientos, P., S. Contente, G. Chinali and M. Cashel (1983)
Ribosomal RNA operon promoters P1 and P2 show different regulatory responses, p. 65-74. In Gene expression.
Alan R. Liss, Inc., New York.

Scherer, G.F.E., M.P. Walkinshaw, S. Arnott and D.J. Morré (1980)
The ribosome binding sites recognized by E. coli ribosomes have regions with signal character in both leader and protein coding segments.
Nucl. Acid Res. 8, 3895-3907.

Seed, B. (1983)
Purification of genomic sequences from bacteriophage librares by recombination and selection in vivo.
Nucl. Acid. Res. 11, 2427-2446.

Shine, J. and Dalgarno, L. (1974)
The 3'-terminal sequence of E. coli 16S ribosomal RNA:
complementary to nonsense triplats and ribosome binding sites.
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1342-1346.

Simoncsits, A., M.L. Tjörnhammar, M. Kalman, I. Cserpan, G. Gafvelin and T. Bartfai (1988)
Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of artificial genes coding for biologically active elongated precursors of the vasoactiv intestinal polypeptide
Eur. J. Biochem. 178, 343-350.

Smith, H.O. and M.L. Birnstiel (1976)
A simple method for DNA restriction site mapping.
Nucl. Acid. Res. 3, 2387-2398.

Southern, E.M. (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Stahl, F.W. (1988)
A unicorn in the garden ?
Nature 335, 112-113.

Stent, G.S. and H. Bremer (1961)
A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 47, 2005-2014.

Sung, W.L., F.L. Yao, D.M. Zahab and S.A. Narang (1986)
Short synthetic oligodeoxyribonucleotide leader sequences enhance accumulation of human proinsulin synthesized in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 561-565.

Sutcliffe, J.G. (1978)
Complete nucleotide sequence of the Escherichia coli plasmid pBR322.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43, 77-90.

Szoke, P.A., T.L. Allen and P.L. deHaseth (1987)
Promoter recognition by Escherichia coli RNA polymerase:
Effects of base substitutions in the -10 and -35 regions.
Biochem. 26, 6188-6194.

Tabak, H.F. and R.A. Flavell (1978)
A method for the recovery of DNA from agarose gels.
Nucl. Acid. Res. 5, 2321-2332.

Travers A.A., R.I. Kamen and R.F. Schleif (1970)
Factor necessary for ribosomal RNA synthesis.
Nature 228, 748-751.

Travers A.A. (1973)
Control of ribosomal RNA synthesis in vitro.
Nature 244, 15-18.

Travers A.A. (1976)
RNA polymerase specificity and the control of growth.
Nature 263, 641-646.

Travers, A.A. (1980/a)
A tRNA(Tyr) promoter with an altered in vitro response to ppGpp.
J. Mol. Biol. 141, 91-97.

Travers, A.A. (1980/b)
Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis.
J. Mol. Biol. 141, 973-976.

Travers, A.A. (1984)
Conserved features of coordinately regulated E. coli promoters.
Nucl. Acid. Res. 12, 2605-2618.

Ullman, A. and Perrin, D. (1970)
Complementation in beta-galactosidase. In: The lactose operon.
ed.: Beckwith, J.R. and D. Zipser, Cold Spring Harbor Lab.
New York.

Walker, G.C. (1987)
The SOS response of Escherichia coli:
in Cellular and Molecular Biology, ed. F.C. Neidhard
(Am.Soc.Microbiol., Washington,DC) 1346-1357.

Winberg, G. and M. Hammarskjöld (1980)
Isolation of DNA from agarose gels using DEAE-paper. Application to restriction site mapping of adenovirus type 16 DNA.
Nucl. Acid. Res. 8, 253-264.

Winslow, R.M. (1971)
A consequence of the rel gene during a glucose to lactate downshift in Escherichia coli.
J. Biol. Chem. 246, 4872-4877.

Wright, J.J. and R.S. Hayward (1987)
Transcriptional termination at a fully rho-independent site in Escherichia coli is prevented by uninterrupted translation of the nascent RNA.
EMBO J. 6, 1115-1119.

Wu, H.M. and Crothers, D.M. (1984)
The locus of sequence directed and protein induced bending.
Nature 308, 509-513.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira and J. Messing (1985)
Improved M13 Phage cloning vectors and host strains:
Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene 33, 103-119.

Zacharias, M., H.U. Göringer and R. Wagner (1989)
Influence of the GCGC discriminator motif introduced into the ribosomal RNA P2- and tac promoter on growth-rate control and stringent sensitivity.
Embo J. 8, 3357-3363.

Zacharias, M., H.U. Göringer and R. Wagner (1990)
The signal for growth rate control and stringent sensitivity in E. coli is not restricted to a particular sequence motif within the promoter region.
Nucl. Acid. Res. 18, 6271-6275.

Zoller, M.J. and M. Smith (1983)
Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13-derived vectors.
Meth. Enzymol. 100, 468-500.

Zoller, M.J. and M. Smith (1984)
Oligonucleotide-directed mutagenesis:
A simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template.
DNA 3, 479-488.