B3048

Az *rrnB* riboszómális RNS operon komplex transzkripciós terminátorrégiójának molekuláris analízise

Egyetemi doktori értekezés

Készítette: Orosz András

Tudományos munkatárs

MTA Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézete

1990

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki a Szegedi Biológiai Központ mindazon dolgozóinak, akik a dolgozat elkészítésében érdeklődésükkel, tanácsaikkal, preparátumaik rendelkezésemre bocsájtásával segítségemre voltak. Külön megköszönöm témavezetőm, Venetianer Pál hasznos útmutatásait, és a kísérletes munkához szükséges feltételek biztosítását. A munkám kezdeti szakaszában nyújtott sok segítségért Boros Imrét illeti köszönet.

A laboratórumi munkában nyújtott magas színvonalú közreműködéséért Anton Józsefnének vagyok hálás. A dolgozat ábraanyagának összeállításában résztvevő Zámbori Ferencné, és Borka András lelkiismeretes és pontos munkáját is e helyen köszönöm meg.

A dolgozatban alkalmazott rövidítések jegyzéke

A_{650}: a 650 nm-en mért abszorpció

Ap: ampicillin

APS: ammónium-perszulfát

BAP: bakteriális alkalikus foszfatáz

bp: bázispár

BSA: marha szérum albumin

Ci: curie

CIP: borjúbél foszfatáz

cpm: beütés per perc

Da: dalton

DEAE: dietil-amino-etil

DMS: dimetil-szulfát

DN-áz: dezoxi-ribonukleáz

DTT: ditiotreitol

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

E. coli: Escherichia coli

galK:a galaktokináz enzim génje

IR1,IR2: az rrnB operon két terminátora közötti fordított ismétlődések (inverted repeat-ek) jelölése

IPTG: izopropil-1-thio-β-D-galaktóz

lac pr: a laktóz operon promótere

kb: kilobázis (ezer bázispár)

MCS: poliklónozó hely

mRNS: messenger (hírvivő) RNS

ORF: open reading frame (nyitott leolvasási sor, fehérjekódolásra alkalmas szekvenciarészlet)

PAGE: poliakrilamid gélelektroforézis

rDNS: a riboszómális RNS-eket kódoló DNS szakasz

RE: restrikciós endonukleáz

RN-áz: ribonukleáz

rRNS: riboszómális RNS

rpm: fordulat per perc

S.D.:Shine-Dalgarno szekvencia, riboszómakötő hely

SDS: nátrium-dodecil-szulfát, nátrium-lauril-szulfát

T1,T2: az rrnB operon két terminátora

Tc: tetraciklin

TEMED: N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin

Tris: trisz-(hidroximetil)-amino-metán

Tris-HCl: trisz-(hiroximetil)-amino-metán hidroklorid

tRNS: transzfer RNS

UP-víz: ioncserélt (ultrapure) víz

UV: ultraviola

A listán fel nem sorolt, de a dolgozatban szereplő további rövidítések (restrikciós endonukleázok, nukleotidok, nukleotid-trifoszfátok, bakteriális genetikai markerek rövidítései stb.) a nemzetközileg általánosan elfogadott és használt nomenklaturákhoz igazodnak.

A kísérletes munka során alkalmazott, a szövegben rövidítéssel jelölt oldatok és táptalajok összetételét az "Anyagok és módszerek" című fejezet tartalmazza.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldalszám.
I. BEVEZETÉS	1.
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
II.1. A terminátorok típusai	6.
II.1.1. I-es típusú (egyszerű) terminátorok	6.
II.1.2. II-es típusú terminátorok	12.
II.1.2.1. Rho-dependens terminátorok	12.
II.1.2.2. L4 protein dependens terminátorok	16.
II.1.2.3. Nun protein dependens terminátorok	16.
II.1.2.4. A lac represszor okozta termináció	16.
II.1.2.5. Tau faktor dependens terminátorok	17.
II.2. A terminációs szignálok magasabbrendű szerveződése	18.
II.3. Terminációs modellek	21.
II.3.1. Az I-es típusú terminátorok terminációs mechanizmusa	21.
II.3.1.1. "Veszteglés" (pausing)	22.
II.3.1.2. Az RNS-polimeráz/RNS/DNS komplex disszociációja (release)	23.
II.3.2. A Rho-dependens termináció mechanizmusa	24.
II.4. A transzkripciós terminación alapuló génszabályozási utak	27.
II.4.1. Attenuáció	28.
II.4.2. Polaritás	33.
II.4.3. Antitermináció	35.
II.4.4. Retroreguláció és processzing	38.
II.5. A riboszómális RNS operonok transzkripciós szabályozása	42.
II.6. Kísérleti rendszerünk, az rrnB riboszómális RNS operon komplex transzkripciós terminátorrégiójának jellemzése	44.

III. CÉLKITŰZÉSEK 47.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 48.

IV.1. A kísérleti munka során felhasznált vegyszerek, preparátumok, izotópok, és baktériumtörzsek ismertetése 48.

IV.1.1. Baktériumtörzsek és plazmidok 48.

IV.1.2. Táptalajok és antibiotikumok 48.

IV.1.3. Restrikciós enzimek és a molekuláris klónozásban alkalmazott egyéb enzimpreparátumok 50.

IV.1.4. Vegyszerek és izotópok 50.

IV.2. A kísérleti módszerek leírása 51.

IV.2.1. Plazmid DNS izolálása 51.

IV.2.2. Fizikai térképezés 52.

IV.2.3. Restrikciós fragmentumok elválasztása gélelektroforézissel 53.

IV.2.4. Molekulatömeg alapján elválasztott DNS fragmentumok visszanyerése agaróz és poliakrilamid gélekből 54.

IV.2.5. DNS fragmentumok összekapcsolása T4 polinukleotid ligázzal 55.

IV.2.6. Átfedő deléciósorozatok kialakítása Bal31 nukleázzal 55.

IV.2.7. E. coli transzformációja plazmid DNS-sel 56.

IV.2.8. DNS minták radioaktív végjelölése 58.

IV.2.9. DNS szekvencia meghatározása Maxam-Gilbert módszerével 59.

IV.2.10. A galaktokináz enzimaktivitás mérése 61.

V. A KÍSÉRLETEK LEÍRÁSA 63.

V.1. Terminátorszelekciós plazmidvektorok kialakítása 63.

V.1.1. A pKL300ΔH terminátorszelekciós plazmid konstrukciója 63.

V.1.2. A pKL02 terminátorszelekciós vektor konstrukciója 65.

V.1.3. A pKL300-17 plazmid kialakítása 67.

V.2. Az rrnB operon terminátorainak elkülönítése más transzkripciós szignáloktól 68.

V.3.1. Átfedő deléciósorozatok kialakítása T1 terminátorban és annak környékén célzott in vitro deléciós mutagenezissel 72.

V.3.2. A T1 terminátor deléciós származékainak kvantitatív in vivo analízise 76.

V.3.3. rrnB T1 - kétirányú terminátor? 79.

V.4.1. Az rrnB gén komplex terminátorrégiójának elemenkénti szubklónozása 82.

V.4.2. A komplex rrnB terminátorrégió önálló elemeinek és az elemek különböző kombinációjának in vivo analízise 84.

V.5.1. A transzláció hatása a terminátoraktivitásra 86.

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE 87.

VI.1. Reverz irányú működőképes terminátorok azonosítása az rrnB operon struktúrgénjein belül 87.

VI.2. A komplex rrnB terminátorrégió önálló elemeinek terminációs hatékonyságai 89.

VI.3. Szimmetrikusak-e a terminátorok? 91.

VI.4. A transzláció hatása a terminációra 93.

VI.5. A T1 terminátor csonkításának hatásai 95.

VI.6. Miért kell két terminátor? 97.

VI.7. A riboszómális RNS operonok terminátorainak specifikus tulajdonságai 98.

VII. IRODALOMJEGYZÉK 103.

I. BEVEZETÉS

Ez a dolgozat egy prokarióta transzkripciós cisz-regulátor, az E. coli rrnB riboszómális RNS operon komplex transzkripciós terminátor régiójának molekuláris analízisét tartalmazza. A dolgozatban ismertetett kísérleteket 1984 és 1990 között végeztem el a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetének Nukleinsav Csoportjában. A prokarióta génexpresszió transzkripciós szintű szabályozásának vizsgálatában kutatócsoportunk már csatlakozásom idején is rendkívül komoly hagyományokkal és eredményekkel rendelkezett. Itt készült el az első részletes restrikciós térkép az E. coli hét riboszómális RNS operonjáról (13,15), amely lehetővé tette egyedi rRNS gének izolálását, felszaporítását és génexpressziós szabályozásuk kiterjedt analízisét az in vitro DNS rekombináció (genetic engineering) eszköztárának felhasználásával.

Csoportunkban az rrnB riboszómális RNS operon sikeres klónozását követően (13,87) a kutatások főleg a struktúrgének előtti, a transzkripció iniciációjáért felelős rendkívül erős promóterek szerkezet-funkciós összefüggéseinek és szabályozásuk mikéntjének felderítésére koncentráltak (13,14,15,33).

1981-ben ismertté vált az operon teljes szekvenciája (25), melynek számítógépes analízise egy érdekes és komplex transzkripciós terminátor régiót jelzett a struktúrgének 3' végén. Mivel ebben az időben a transzkripciós termináció folyamatairól rendkívül szegényes irodalmi adatok álltak rendelkezésre, törvényszerűen fordult a figyelem az ilyen jellegű kutatások irányába, amit a csoporton belüli

munkamegosztás révén én kaptam feladatul.

Dolgozatom bevezetőjében az azóta lényegesen felduzzadt transzkripciós terminációs irodalomból csupán a prokarióta szervezetek, ezen belül is főleg az E. coli terminációs mechanizmusait és a hozzájuk szorosan kapcsolódó más regulációs utakat (antitermináció, attenuáció stb.) tekintem át. Ezt az elvet követem a dolgozat más részeiben is.

Az értekezés megírása során az idegen eredetű, de a magyar nyelvben már meghonosodott szavak, kifejezések esetében következetesen a magyar írásmódot alkalmaztam. Néhány kevésbé ismert, inkább csak a transzkripciós termináció szakirodalmában használt angol kifejezés magyar fordítása mellett zárójelben közlöm az eredeti változatot is.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A génexpesszió transzkripciós szabályozásának első használható és azóta tankönyvi adattá vált modelljét a laktóz operon részletes genetikai analízise alapján építette fel Jacob és Monod 1961-ben (82). Ez a modell az első jelentős áttörés a modern molekuláris biológia egyik központi kérdésének, a differenciált génreguláció mikéntjének megválaszolásában. Az operon elmélet alapján értelmezhető az a tény, hogy bár a prokarióta és eukarióta kromoszómák átlagban több ezer ill. több tízezer gént tartalmaznak, ezek sohasem fejeződnek ki egyszerre és egyforma intenzitással. Minden egyes genetikai egység (baktériumoknál esetenként a gének egy csoportja) önálló szabályozás alatt áll. A transzkripciós szintű reguláció a struktúrgének között elhelyezkedő regulátor szekvenciák (cisz-elemek), valamint a gének átírását végző RNS-polimeráz és egyéb járulékos fehérje molekulák (transz-ható faktorok) kölcsönhatásának eredményeképpen kialakuló bonyolult folyamat. A cisz-regulátor elemek legfontosabb tagjai az RNS láncok iniciációjában résztvevő promóterek, és a láncok befejezéséért, az RNS-polimeráz/templát DNS/naszcensz RNS disszociációért felelős transzkripciós terminátorok (151).

Az elmúlt évtized molekuláris biológiai kutatásai a promóterekről rendkívül színes és árnyalt képet alakítottak ki. Ismertté vált pl. az ún. promóter konszenzus szekvencia, mely egy általános E. coli promóter szerkezetét írja le a primer szekvencia szintjén (pl. 78,151,183). Tudjuk, hogyan befolyásolja a DNS metiláltsági foka, és topológiai állapota a promótererősséget, ismerjük az RNS-polimeráz/promóter kölcsönhatás alapjait (78 és hivatkozásai). Ezzel ellentétben a terminátorokról alkotott elképzelések jóval

szürkébb működési mechanizmust sejtettek (1).

Míg a promóterek többsége a változó környezeti feltételekhez igazodóan regulálható, addig a klasszikus transzkripciós modell szerint az RNS lánc iniciációja után - az elongáció fázisában - az RNS-polimeráz egyenletes sebességgel haladva írja át a templát DNS-t, majd az operon 3' végén a DNS-en kódolt transzkripciós terminációs szignált elérve a DNS/RNS/RNS-polimeráz komplex disszociál (27). Mára világossá vált, hogy a transzkripciós folyamat sohasem egyenletes sebességű: egy génen belül találhatók lassabban és gyorsabban átíródó szakaszok, sőt bizonyos helyeken a transzkripció le is állhat (ún. transzkripciós pausing site-ok). A transzkripciós termináció folyamata sem működik a minden vagy semmi törvényének szabályai szerint. Bizonyos külső vagy belső környezeti feltételek megváltozása számos esetben alapvetően módosíthatja egy transzkripciós terminátor erősségét: egy hatékony terminátor aktivitása csökkenhet, esetleg meg is szűnhet, máskor egy egyébként látens terminátor megváltozott körülmények között maximális hatásfokkal működhet. Vagyis ezek a transzkripciós szabályozó elemek, a korábbi elképzelésekkel ellentétben legtöbbször maguk is reguláltak.

Egy transzkripciós terminátor a sejten belül különböző feladatokat tölthet be (54) :

1. Kijelölve egy transzkripciós egység (operon) határát, lehetővé teszi a szomszédos gén vagy géncsoport egyedi szabályozását.
2. Mint modulátorelem lehetővé teszi a génexpresszió differenciált kontrollját az operonon belül. (pl. attenuáció)
3. Csökkenti az egy transzkripciós egységen belül egymás mögött elhelyezkedő gének transzkripcióját. (természetes polaritás)
4. Leállítja a transzkripciót, ha az adott mRNS-ről képződő fehérje

szintézise gátolt. (mutációs polaritás)

5. Gátolva az elongációt, és a templát DNS-hez való kötődést megakadályozza a sejt számára létfontosságú enzimek (pl. RNS-polimeráz, vagy más fontos transzkripciós regulátor fehérjék) készleteinek kimerülését a citoplazmából.

A tudományos köztudatban általánosan elfogadott az a nézet, hogy az azonos funkciót ellátó regulátorelemek (pl. a promóterek vagy a terminátorok), működésüknek megfelelően és szabályozásuk különbözőségétől függetlenül, olyan közös sajátosságokat mutatnak, melyet egy adott feladat ellátása megkíván.

A napjainkban exponenciálisan növekvő szekvenciaadatok analízise valóban feltárt ilyen általános hasonlóságokat. Noha egy univerzális terminátor konszenzus szekvenciát máig sem sikerült találni, vannak elképzeléseink, hogy az milyen alkotórészekből épülhet fel (19,20). Az elsődleges szekvencián túl azonban számos egyéb hatás eredőjeként áll elő egy adott terminátor felhasználhatósági köre és erőssége : befolyásolja azt a képződő RNS lánc másodlagos, és harmadlagos szerkezete, az átírást végző RNS-polimeráz karaktere, és más járulékos fehérjefaktorok közreműködése (54). Mindezek a tényezők külön-külön olyan elvi lehetőséget is jelentenek, melyen keresztül a transzkripció terminációja - igazodva a sejt mindenkori metabolikus vagy egyéb igényeihez - kontrollálható.

A komplex génexpressziós szabályozásból dolgozatomban először a transzkripciós termináció nukleinsav szignáljait, ezután a folyamatban résztvevő fehérjék tulajdonságait, majd a különböző terminációs mechanizmusok jelenlegi modelljeit veszem sorra. Ezt követően kerül sor a terminációra épülő génexpressziós kontrollok részletes tárgyalására, különös tekintettel azokra, melyek kísérleti rendszerünk

szempontjából jelentőséggel bírnak.

II.1. A terminátorok típusai

A bakteriális transzkripciós terminátoroknak in vitro kísérletes adatok alapján két alaptípusát különböztethetjük meg: az ún. faktor independens és a faktor dependens terminátorokat (1,54,76,135).

Az utóbbi néhány év eredményei mutattak rá, hogy még ezek az önkényesen kijelölt kategóriák is meglehetős rugalmassággal kezelendők, mivel egy terminátor in vitro viselkedéséből az in vivo körülmények közötti tulajdonságaira csak elég nagy bizonytalansággal következtethetünk. Vagyis ez a fajta kategorizálás inkább a transzkipciós terminációs folyamatról szerzett ismereteink hiányosságait mutatja a tényleges állapotok helyett, s csupán pragmatikus okokból van létjogosultsága mindaddig, míg egy a természetes viszonyokat hívebben tükröző csoportosítás fel nem váltja (136).

II.1.1. I-es típusú (egyszerű, faktor independens) terminátorok

Ebbe a kategóriába sorolhatók mindazok a terminátorok, melyek in vitro körülmények közötti hatékony működésükhöz a DNS templátot átíró RNS-polimeráz molekulán kívül semmiféle más fehérjefaktort nem igényelnek. Néhány esetben a terminációs folyamatot az RNS lánc és az RNS-polimeráz disszociációja is követheti a templát DNS-ről.

Ezek a terminátorok meglehetősen hasonló elvek szerint épülnek fel: valamennyi ismert I-es típusú terminátorban egy 20-30 bp hosszúságú GC-gazdag, a középpontjában néhány nukleotiddal megszakított

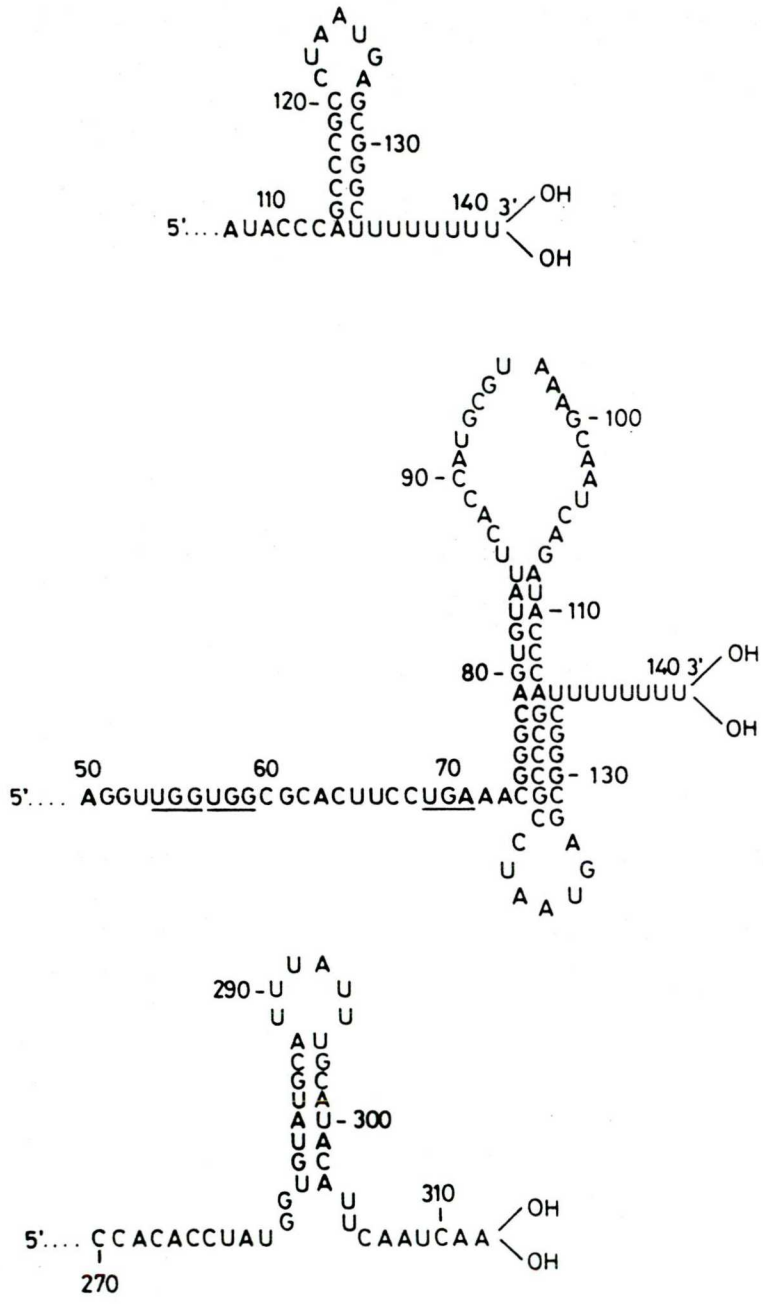
tükörszimmetrikus szegment előzi meg a termináció helyét (19). A GC-gazdag tükörszimmetrikus szakaszt minden esetben egy 4-8 tagból álló U-sorozat követi a naszcensz RNS láncban, melyek valamelyikén (nem minden esetben egy meghatározott nukleotidon) következik be az RNS lánc terminációja (155). Az 1-es ábra néhány egyszerű terminátor felépítését mutatja be.

Sok szerző tartja I-es típusú terminátor konszenzus szekvenciának a CGGG(C/G) terminációs pontot megelőző, vagy a TCTG terminációs pontot követő számos terminátorban előforduló motívumokat is (19), bár ezek létjogosultsága erősen vitatható.

A faktor independens terminátorok modelljei is ezekből a primer szekvencia szintjén megmutatkozó sajátságokból indulnak ki és feltételezik, hogy:

1. A tükörszimmetrikus szekvenciák bázispárosodással egy intramolekuláris hajtűstruktúrát képeznek a naszcensz RNS-ben. (hajtű, nyél és hurok, hairpin vagy stem and loop néven ismertek a szakirodalomban; lásd pl. 48,81,151)
2. A hajtű lefutó szárát követő U-sorozat megkönnyíti a transzkriptum disszociációját a DNS templátról, mivel a rU-dA RNS-DNS hibridek a kinetikai mérések alapján rendkívül instabilak (48,112).

Ezt az elképzelést támasztják alá azok a megfigyelések, melyek szerint az inverted repeat-et érintő mutációk általában jelentősen befolyásolják a terminációt. Azok a mutációk, melyek emelik az RNS hajtű stabilitását (pl. AT/GC transzverziók vagy a tükörszimmetrikus részt megnyújtó inszerciók) növelik a terminációt (151,194), míg a hajtű termodinamikai stabilitásának csökkentése fordított jellegű mutációkkal (GC/AT transzverzió vagy a hajtű rövidülése delécióval) csökkenti a terminációt (lásd mint előbb).



1. ábra. Az ábrán néhány jellegetes I-es típusú (egyszerű) bakteriális transzkripciós terminátor RNS (a lambda 6S, a trp attenuátor, és a lambda cro terminátor) másodlagos szerkezetét tüntettük fel. Jól látható az általában GC-gazdag nyél és a nyél két szárát összekötő néhány bázispáros hurokszerkezet, valamint a terminációs végpontot megelőző U-sorozat (1).

A terminális uridinek számának csökkentése is gyöngíti a terminációs képességet. Egy szisztematikus vizsgálat (107) adatai szerint a 9 U-ből 1-3 minden következmény nélkül eltávolítható, 4-6 U-ig lineárisan csökken a terminációs efficiencia, míg két maradék uridin esetében nem figyelhető meg termináció.

Történtek vizsgálatok a terminátorok mögötti szekvenciák szerepének felderítésére is. Ezek analízisére in vitro inszerciós vagy deléciós mutagenezis technikákat alkalmaztak elsősorban. Megállapították (153), hogy a terminátorok mögé beépített egészen rövid (9 bp) , vagy kiterjedt DNS szakaszok (1400 bp) nincsenek hatással a terminációra. Deléciós vizsgálatokkal a trp operonnál a mutánsok három típusát tudták elkülöníteni (9). Ahol a deléció elérte az inverted repeat középpontját, a termináció teljesen megszűnt, ahol a deléciós végpont a terminátor mögött volt lokalizálható (kb. 10 bp-ra) nem tapasztaltak csökkenést a működésben. A terminátorból csupán részleteket eltávolító deléciók, melyek a stem and loop egy részét érintetlenül hagyták, átmeneti hatást okoztak. Ezek a kísérletek azt látszottak igazolni, hogy - hasonlóan a promóterrégiókhoz - a terminációs pont előtti kb. 35 nukleotid szükséges a hatékony működéshez.

Más vizsgálatok, amelyekben a trp operon terminátorát fúzionálták különböző deléciókkal a lacZ génhez azt mutatták, hogy a terminátor mögötti kb. 60 nukleotidnak szerepe lehet a folyamatban (65). A kérdés megítélésében az irodalmi adatok meglehetősen ellentmondásosak.

Hasonlóan igaz ez a terminátorok hajtűszerkezetét megelőző szekvenciákra is. Erősen valószinűsíthető, - mint ahogyan azt többen feltételezik is - hogy az átíródott RNS lánc stuktúrált, erőteljes másodlagos vagy harmadlagos szerkezettel rendelkező szakaszai kölcsönhatásba lépve a terminátorral, vagy a terminátornál veszteglő

RNS-polimerázzal RNS-RNS és/vagy RNS-fehérje kölcsönhatások révén komolyan befolyásolhatják a terminációt (8). Az ilyen jellegű kölcsönhatások mélyebb analízise, mely az elkövetkező évek egyik rendkívül ígéretes kutatási területének mutatkozik adhat pontosabb választ a felvetett kérdésekre.

A mutációs analíziseken kívül ribonukleotid analógokkal végzett kísérletek is nagymértékben alátámasztják azt a feltételezést, hogy az RNS-transzkriptum (ti. az átíródott terminátor) határozza meg a terminációs szignált. Egyszerű terminátoroknál az ITP csökkenti, a jodo-CTP növeli a terminációt, míg a BrUTP jelentősen megemeli a terminátorokon keresztüli átírást (3,100,119,134). Ha hasonló nukleotid analógokat építünk be a DNS templátba, nem tapasztaljuk a fenti változásokat, kivéve ha a báziscserék a hajtű utáni rU-dA régióba esnek (49).

Az RNS hajtű szerepe a terminációban rendkívül sokrétű lehet (136) :

1. Csökkentheti a templát-transzkript kölcsönhatás kiterjedtségét, amely a GC gazdag régióban különösen előnytelen az RNS lánc disszociációja szempontjából.
2. Olyan szignált jelent, melyet az RNS-polimeráz felismer és ott leállítja a további transzkripciót.
3. Fontos regulációs pont lehet, mivel a hajtűszerkezet kialakulásának enyhe változásai drámai módon befolyásolhatják a termináció hatékonyságát.
4. Megvédi a keletkezett traszkriptumot a 3' exonukleázok általi degradációtól.

Mindezek a funkciók nem feltétlenül egymást kizáró módon valósulnak meg, bizonyos mértékig mindegyik hatása érvényesülhet a terminációs folyamat valamelyik szakaszában.

Ismerünk jónéhány olyan terminátort, ahol - kissé meglepő módon - a GC-gazdag tükörszimmetrikus szakaszt megelőzően egy hosszabb (4-10 tagú) adenin sorozat lokalizálható. Ez az A-sorozat szimmetrikus párja a terminátort követő U-kódoló régiónak és felveti azt az elvi lehetőséget, hogy az ilyen terminátorok mindkét orientációban működnének. Ebbe a csoportba sorolhatók a leu, thr és ilvB attenuátorok (53,58,86), a riboszómális RNS-ek terminátorai (25,192), a atp operon terminátora (161), valamint az ompA és a rho gének terminátorai (130,131). Néhány esetben valóban demonstráltak is in vitro vagy in vivo kétirányú működést, bár ezek az eredmények - figyelembe véve a terminátorok aszimmetrikus elemeit - fenntartásokkal kezelendők.

Ezeknél a terminátoroknál - bármelyik irányból is történne az átírás - az RNS-polimeráz a terminátorok proximális oldalán A-nukleotidsort épít be, amely a GC-gazdag régiót követő U-sorozattal bázispárosodhat. Ennek a különleges és a terminátorok többségében hiányzó kölcsönhatásnak a természete és fontossága még közel sem tisztázott. A kétirányú termináció potenciális "haszna" lehet egy létfontosságú gén mögött elhelyezkedő, de vele ellentétesen átíródó terminátor nélküli gén transzkripciójának leállítása, mely egyébként komoly zavarokat okozhatna a baktériumsejt finoman balanszírozott transzkripciójában.

A fenti megállapítások az I-es típusú terminátorokra vonatkoznak, melyek az in vitro kísérletek adatai szerint működésükhöz az RNS-polimerázon kívül más fehérjefakort nem igényelnek. Hogy in vivo körülmények között ezek a terminációs reakciók másképpen zajlanak, arra a következő kísérletes bizonyítékok hívják fel a figyelmet:

1. A reakciók jóval kevésbé hatékonyak in vitro, mint in vivo.

2. Az E. coli terminációs fehérjéi befolyásolják a termináció hatékonyságát bizonyos I-es típusú terminátoroknál is.

A legismertebb ilyen fehérje (a Rho-faktor) elősegíti a terminációs folyamatot két I-es típusú lambda terminátornál (79,123,163), míg a Rho egy másik protein (NusA) közreműködésével hasonló hatást vált ki az E. coli trp operonjának terminációjában (60,79,90,93).

II.1.2. II-es típusú terminátorok

Definíció szerint ebbe a kategóriába sorolhatók mindazok a terminátorok, amelyek az első csoportból kimaradtak. Ezeknél a terminációs helyeknél sem GC-gazdag tükörszimmetrikus szakaszokat, sem az ezeket követő U-sorozatokat nem találunk és a kiterjedt struktúrális vagy szekvenciahomológia keresésére irányuló próbálkozások is eredménytelenek maradtak (54,76,136).

A II-es típusú terminátorok számos alcsoportja közül csak a legfontosabbat, az ún. Rho-dependens terminátorokat tárgyaljuk részletesen.

II.1.2.1. Rho-dependens terminátorok

Bár mind in vitro mind in vivo kísérletekből számos bizonyíték áll rendelkezésre, hogy az E. coli Rho proteinje a baktériumkromoszóma és bakteriofágok genomjának specifikus helyein képes a transzkripció terminációjára (40,147), a terminációs végpontok szekvenciáinak összehasonlító analízise kevés közös sajátságot tárt fel (19,116,136). Ennek egyik fő oka az, hogy viszonylag csekély számú Rho-dependens terminátor nukleotidsorrendje ismert és ezek közül is csupán hármat, a

lambda t_{R1} (32,96,117,146,153), a trp t' (169,188), és a tyrT terminátorokat (91,157) tanulmányozták részletesen.

Az ismert Rho-dependens szekvenciák esetében a terminátorok jellemzői nagyfokú változatosságot mutattak attól függően, hogy milyen gén működését regulálták, és milyen organizmusból származott a terminátor. Úgy tűnik, a széles körű általánosításhoz jóval több Rho-dependens szignál szekvenciaadataira és részletes jellemzésére van még szükség.

A lambda fág jobb karján in vitro kísérletek alapján öt tandem Rho-dependens terminátort azonosítottak. Mindegyikben megfigyeltek rövid kiterjedésű tükörszimmetrikus szekvenciákat, bár ezek - az I-es típusú terminátorokkal ellentétben - inkább AT nukleotidokban gazdagok. Mivel a potenciális hajtűk termodinamikai stabilitása a GC nukleotidok hiánya miatt rendkívül alacsony, kérdéses, hogy ezek in vivo körülmények között egyáltalán kialakulnak-e. Mindegyik terminátor más-más érzékenységet mutat a Rho és NusA proteinekkel szemben és másképpen reagál a sókoncentráció változtatására is (96,117).

A lambda t_{R1}II Rho-dependens terminátorok összehasonlítása más hasonló karakterű szignálokkal - $tRNS^{tyr}$, lambda t_{R0}, ColE1 - feltárt ugyan számos közös sajátságot, de a leginkább meggyőző homológiát mutató szakaszok mint Rho-dependens terminátorok teljesen hatástalanok voltak (98). A lambda t_{R1} terminátor előtti szekvenciák deléciós analízise azt mutatta, hogy hosszabb folyamatos deléciók megszüntetik a Rho-dependens terminációt, míg ugyanazon a régión belüli de rövid kiterjedésű mutációk nem befolyásolják jelentősen a terminátor működését (95). A megfigyelések azt a következtetést sugallták, hogy - hasonlóan a trp t'-höz - a Rho-dependens termináció szignáljai a terminációs végpont előtti RNS szakaszra lokalizálhatók.

A trp operonban az in vivo transzkripciós "átolvasást" (readthrough) megnövelő mutációk analízise vezetett a géncsoport 3' végén tandem elhelyezkedő terminátorok felfedezéséhez (189). Ezek közül a második terminációs pont a trp t', - mely egy AT-gazdag, másodlagos szerkezet kialakítására kevéssé alkalmas régióban található - igen hatékony terminátor. Működéséhez mind in vitro, mind in vivo Rho faktort és a terminációs pont előtti meglehetősen hosszú mRNS szekvenciát igényel, amint azt a deléciós analízisek igazolták (57,169). Ez a terminációs pont előtti régió önmagában is hatékony Rho-dependens terminációt biztosít kb. 50-100 nukleotid távolságra annak végpontjától, függetlenül attól, hogy ott egyébként milyen szekvenciák találhatók (137).

Az összegyűlt kísérleti adatokból az alábbi általános következtetések vonhatók le a Rho-dependens terminátorok sajátságait illetően:

1. A terminációs végpontot közvetlenül megelőző szekvenciák önmagukban nem hatékony terminátorok.
2. A terminációs végpont(ok) előtt jelentős távolságra elhelyezkedő szekvenciák határozzák meg a terminációs szignált, feltehetőleg a mRNS és a Rho faktor közötti kölcsönhatás révén.
3. Egy kb. 80 bp hosszúságú régió kódolja a terminációs szignál jelentős részét.
4. Egy nem struktúrált RNS régió önmagában nem elégséges terminációs szignál.
5. Maguk a terminációs végpontok semmiféle különösebb szekvenciaspecifitást nem mutatnak.

Mindezek a tulajdonságok mellett úgy tűnik, hogy a kiterjedt Rho-dependens terminátorrégió C-tartalma szintén fontos feltétele a

terminációnak.

Csak a közelmúlt kutatásai mutattak rá arra, hogy a terminációs pont előtti hosszú, struktúrálatlan RNS-nek mi lehet a szerepe a folyamatban. A lambda t_{R1} terminátor - de más hasonló szignálok is - kb. 100 nukleotidra a mRNS végétől olyan szekvenciarészleteket tartalmaznak, melyek a Rho terminációs fehérje megkötéséért felelősek. Ezeket a motívumokat rut szekvencia (Rho utilisation sequence) néven tartja számon az irodalom (159). Olyan egyes szálú oligonukleotidok, melyek a rut szekvencia komplementerei meggátolják a terminációt, ami a rut RNS aktív részvételét valószinűsíti a folyamatban. A gátlás specifikus, mivel más, szomszédos régiókkal komplementer oligonukleotidok nem mutatják ugyanezt a hatást. A rut szekvencia a CACAYYY és a CNNNC eléggé laza konszenzusokkal írható le (54). A prokariótákban leggyakrabban előforduló és valószinűleg legjelentősebb I-es típusú (faktor independens) és II-es típusú Rho faktor dependens terminátorok fontosabb sajátságait mutatja be az 1-es táblázat:

	Faktor independens	Rho-dependens
Nukleinsav szignál	RNS	RNS
Elhelyezkedése	A végpont előtt kb. kb. 20 bp-ra	A végpont előtt több, mint 50 bp-ra
Jellemzői	Hajtű és uridinek	G-k hiánya
RNS-RNS kölcsönhatás	van	Valószinűleg nincs
RNS-DNS kölcsönhatás	van	Nem ismert
DNS-DNS kölcsönhatás	nincs	Valószinűleg nincs
NTP hidrolízis	nincs	van

1. táblázat. A bakteriális transzkripciós terminátorok összehasonlítása (76) alapján.

II.1.2.2. L4 protein dependens terminátorok

A fölöslegben levő szabad riboszómális L4 protein csökkenti a több riboszómális fehérjét - közöttük az L4-et - kódoló 11 génes S10 operon expresszióját (104,191). Az L4 fehérje egy 140 bp-os leader szekvencia végén fejti ki transzkripciós terminációs hatását. A leader RNS 3' vége egy I-es típusú terminátorhoz hasonló potenciális hajtűstruktúrát és azt követően egy U-sorozatot tartalmaz. Bár nem ismert, hogy az L4 fehérje hogyan hat, a hajtűszerkezet tartalmaz egy 9 bp-os szekvenciát, mely tökéletesen megegyezik a 23S RNS L4 kötőhelyével (UAAUGGGUCC). Ez az azonosság azt sugallja, hogy az L4 fehérje a hajtűhöz való kötődés útján terminálja saját operonja transzkripcióját.

II.1.2.3. Nun protein dependens terminátorok

A HK022 lambdoid fág génterméke szintén specifikus transzkripciós terminációs faktor, mely efficiensen gátolja meg a lambda fág p_L és p_R promótereiről induló transzkripciót. A fehérje célszekvenciája a fág nut régiója (148). Érdekes megjegyezni, hogy a lambda fág legismertebb antiterminációs fehérjéje (az N protein) ugyanezt a motívumot ismeri fel, viszont a transzkripciót végző RNS-polimerázt éppen ellentétesen a régió mögötti terminátorok átírására programozza. Mindkét protein E. coli gazdafehérjékkel együtesen (pl. NusA, NusB) fejti ki hatását.

II.1.2.4. A lac represszor okozta termináció

A lac operon szabályozásában részvevő fehérje szintén képes a

transzkripció terminációjára. A lacI gén végén elhelyezkedő lac represszor kötőhely a represszor jelenlétében mind in vitro, mind in vivo hatásos terminátor (167). Más kísérletek szerint egy promóter mögé jelentős távolságra beépített (kb.750 bp-ra) lac operátor szekvencia represszor hiányában gyönge, jelenlétében tisztított rendszerben és natív körülmények között is kifejezetten erős terminátor (41). Ez a transzkripciós terminációs hatás mind prokarióta, mind eukarióta (42) szervezetekben kiváltható és mechanizmusa valószinüleg lényegesen különbözik az autentikus terminációs funkciótól. Mivel a lac represszor célszekvenciája a 21 bp hosszúságú specifikus lac operátor DNS, a fehérje inkább az RNS-polimeráz mechanikus blokkolásával mintsem valódi terminációs folyamattal akadályozza meg a további transzkripciót. A represszor inaktiválásával (pl. IPTG-vel) az erős termináció felfüggeszthető.

II.1.2.5. Tau faktor dependens terminátorok

Ezt a fehérjefaktort a T3 fág korai operonjának transzkripciós terminációs vizsgálatai során azonosították. A terminációt kiváltó szekvencia in vivo rendkívül hatékony, de in vitro körülmények között teljesen hatástalan még Rho faktor jelenlétében is (22,46). Egy E. coli protein - a Tau - viszont tisztított rendszerben képes terminációt előidézni ugyanolyan T3 szekvenciáknál, ahol azt in vivo körülmények között megfigyelték (22). Hasonló jelenséget írtak le a rokon T7 fág esetében is (22). In vitro körülmények között Tau faktor nélkül a transzkripció terminációja a T7 fág esetében az in vivo megfigyelt helyek mögött következik be.

A 2. táblázatban azokat az E. coli géneket tüntettük fel, melyek

géntermékei a transzkripciós terminációt vagy antiterminációt befolyásolják.

Gén	Alternatív név	Kromoszómális pozíció (min)	Géntermék	Szerepe	Más releváns fenotípusa
nusA	L	69	55,000 D-os fehérje	transzkripciós termináció és antitermináció	-
nusB	-	11	15,000 D-os fehérje	transzkripciós termináció és antitermináció	nusA1 és nusE71 szuppresszor
rho	nusD	85	Rho	transzkripciós termináció	-
rpoB	nusC	82	az RNP béta alegysége	transzkripció	-
rplD	-	73	L4 riboszómális protein	transzláció	terminációs reguláció az S10 operonban
rplP	sne	73	L16 riboszómális protein	transzláció	nusA1 és nusE71 szuppresszor
u	-	90	-	-	nusA1 és nusE71 szuppresszor
lacI	-	8	Lac represszor	a lac operon szabályozása	terminációs faktor a lac operátorral együtt
tau	-	-	-	termináció	-

2. táblázat. A jelenleg ismert transzkripciós terminációt és antiterminációt befolyásoló E. coli gének és a géntermékek fontosabb sajátságai.

II.2. A terminációs szignálok magasabb rendű szerveződése

Számos terminátorrégió érdekes sajátsága a több, tandem elhelyezkedő terminátorszignál, melyek magasabb szintű szerveződése moduláris elrendezést mutat (2. ábra). Egy csoporton belül az egyedi terminációs helyek mind erősségben, mind faktorigényben lényegesen különbözhetnek egymástól. A fenti jelenségre példa a lambda t_{R1} terminátor (96,117,153), az E. coli és Salmonella typhimurium trp operon terminátorai (121,189), a $tRNS^{Tyr}$ terminátorai (91,157), és az rrnB operon terminátorai (25).

Egyes komplex terminátorrégión belül - pl. a lambda t_{R1}-nél és a trp t'-nél megfigyelhető esetekben - a termináció heterogén, amely a génhez közelebbi terminációs szignálok alacsonyabb szintű (nem 100%-os) működéséből adódik. In vitro rendszerekben a reakciókörülmények megváltoztatása, vagy más fehérjefaktorok alkalmazása jelentősen megváltoztathatja az adott terminációs mintázatot (96,134). Sok esetben a függetlenül szabályozható tandem terminátorok szükségességének okait ma még homály fedi.

lambda t_{R0} CGGCGTATATCAAAGCGCGATCAACAAGGCCATTCATGCCAGGCCGAAAGA

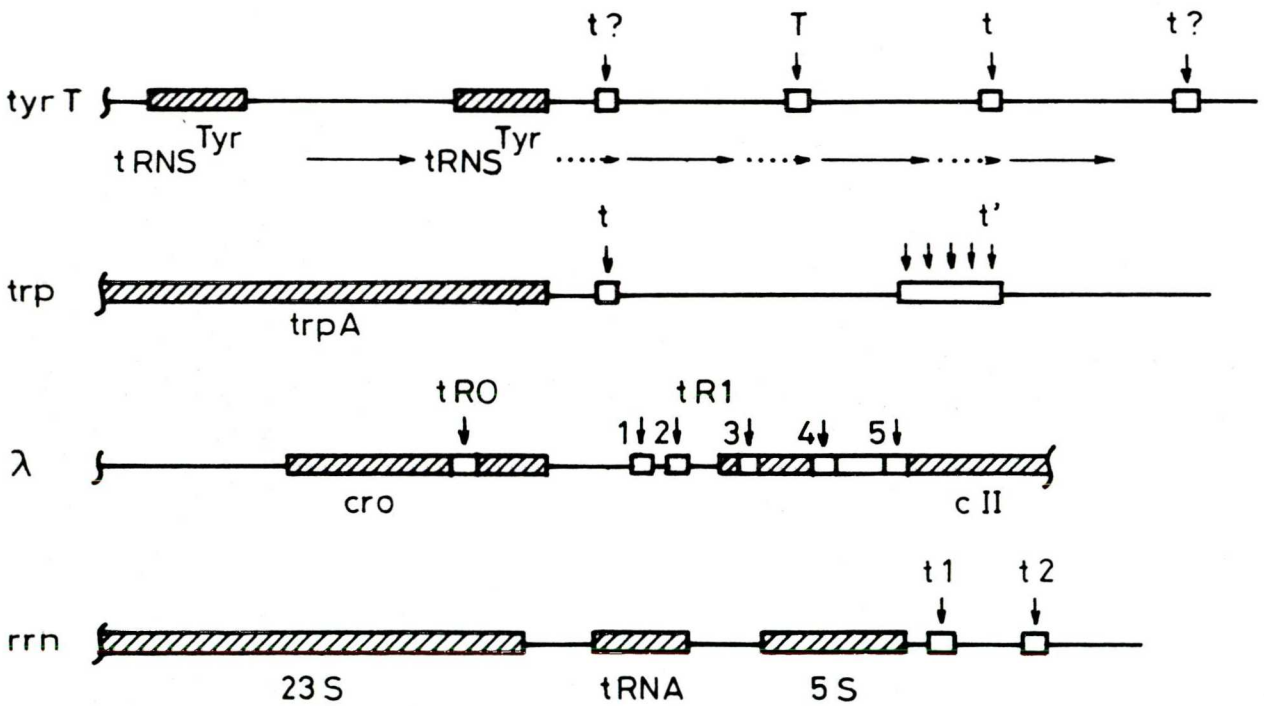
lambda t_{R1} TAAACCACACCTATGGTGTATGCATTTATTTGCATACATTCAATCAATTGTTATCTAAGGAAATACTTACATATGGTTCGTGAAACAAA

trp t' CCTCAAAATATATTTTCCCTCTATCTTCTCGTTGCGCTTAATTTGACTAATTCTCATTAGCG

rrnB t_L GAATACCAAGTCTCAAGAGTGAACACGTAATTCATTACGAAGTTTAATTC

lacI GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATAATG

tyrT TTCAAAAGTCCCTGAACTCTCAAGCGAATCCGCAATCAAATATTCTGCCCATGCGGGGAAGGA



2. ábra. Néhány komplex terminációs szignál szerkezete. A nukleotidsorrenden belüli aláhúzások ill. az ábrák fölötti nyilak azokat a szakaszokat jelölik, ahol a termináció bekövetkezik. Az egyes terminátorokra vonatkozó konkrét hivatkozások a szövegben találhatók.

II.3. TERMINÁCIÓS MODELLEK

Még a legismertebb, legjobban karakterizált terminációs szignálok esetében is (faktor independens ill. Rho faktor dependens terminátorok) rendkívül különböző és egymással ellentétes elméletek léteznek a transzkripciós termináció mechanizmusának magyarázatára (94). A jelenlegi modellek a terminációs szignálok elsődleges és másodlagos szerkezetének általános sajátságaiból kiindulva igyekeznek következtetni azokra a változásokra, melyek az RNS-polimeráz/RNS/DNS templát terner komplex szerkezetében a terminációs helyeknél bekövetkeznek és végső soron a transzkripció terminációját okozzák. Az egyes szerzők általában a folyamat különböző aspektusaira (kinetikai, enzimatikus, struktúrális stb.) helyezik a hangsúlyt és gyakran erre vezethetők vissza a modellek egymásnak ellentmondó következtetései is. Bár az utóbbi pár évben jelentős előrelépés történt a területen, a modellépítést joggal hasonlíthatjuk egy olyan kirakós játékhoz, melynek elemei ma még meglehetősen hiányosak. A teljes kép kialakítása a hiányzó darabok megkeresésén túl azok megfelelő módon történő összeépítését is igényli. (Valószinűleg ez lesz a feladat idő és munkaigényesebb része.)

Dolgozatomban a két legjelentősebb prokarióta terminátortípus jelenleg általánosan elfogadott terminációs modelljeit ismertetem a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján.

II.3.1. Az I-es típusú terminátorok terminációs mechanizmusa

A transzkripciós iniciáció után az RNS-polimeráz egy RNS/DNS hibridet tartalmazó DNS "buborékot" képez, melyben a kitekeredett DNS

17±1 bp hosszú, az RNS/DNS heteroduplex pedig 12±1 bp.(ún. open komplex) A buborék sajátságos érési folyamaton megy keresztül és a szigma iniciációs faktor disszociációja után proteáz rezisztens elongációs konformációt vesz fel (122). Az elképzelések szerint az elongációs periódusban a komplex paraméterei nem változnak meg és a terminációs szignálokat ebben az ún. elongációs konformációban ér el.

A terminációs folyamat két egymástól időben is elkülöníthető szakaszra, az ún. transzkripciós "veszteglésre" (pausing), és az RNS/DNS heteroduplex/RNS-polimeráz disszociációjára (release) osztható (54,135,136,183). Ez idő alatt az elongációs komplex is jelentősen átalakul, konformációs változások után létrejön az ún. terminációs komplex.

II.3.1.1. "Veszteglés" (pausing)

In vitro körülmények között az RNS-polimeráz különböző okok miatt - beleértve a terminációs szignálokat is - szakíthatja meg rövidebb-hosszabb időre a transzkripciót.

Ilyenek lehetnek:

1. A nukleotid trifoszfát készletek kimerülése (85).
2. Tükörszimmetrikus szekvenciák jelenléte, melyek hajtűszerű másodlagos struktúrák kialakítására képesek (187).

Mint azt már említettük a hajtűk minden bizonnyal a naszcensz RNS-en belül képződnek, mivel ribonukleotid bázisanalógok beépítésével (pl. ITP) a szünetek hossza is változtatható (119). Ellenkezőleg, a DNS szuperhelikális állapotának megváltoztatása (mely a DNS hajtűk kialakulására van kihatással) nem jár hasonló következményekkel (156). Az RNS nyél és hurokszerkezetek olyan kölcsönhatásba léphetnek az

RNS-polimeráz molekulával, mely megakadályozza a további elongációt. Jónéhány olyan megfigyelés is van azonban, amely ellentmond ennek az egyszerű modellnek. Ismerünk pl. olyan hajtűszerkezeteket, amelyek nem idézik elő a transzkripció időleges veszteglését (92), viszont számos stem and loop szerkezet kialakítására alkalmatlan szekvencia képes a transzkripció időleges felfüggesztésére (63). Végül, egy terminátor tükörszimmetrikus elemek közötti hurkának mutációi bizonyos esetekben növelhetik a szünetek hosszát és a termináció hatékonyságát (54). Utóbbi adatok inkább a primer szekvencia, mint egy másodlagos szerkezet jelentőségét hangsúlyoznák a terminációban: pl. egy erős DNS/RNS hibrid az RNS-polimerázhoz való kötődése révén lelassíthatja a transzlokáció sebességét, meggátolva ezáltal az RNS lánc további növekedését. Az irodalmi adatok egy másik - és valószinűleg a valósághoz közelebb álló - interpretációja lehet, hogy a terminátorok aszimmetrikus szakaszai olyan harmadlagos RNS szerkezetek (ún. bulged struktúrák 138,139) kialakításában fontosak, melyeknek - eddig nem tisztázott módon - kulcsszerepe lehet a transzkripció terminációjának folyamatában. A kérdésre a terminátor RNS-ek harmadlagos struktúrájának RTG-diffrakciós vagy NMR-es felderítése adhatja meg a választ.

II.3.1.2. Az RNS-polimeráz/RNS/DNS komplex disszociációja (release)

A komplett termináció, - melynek során mind az RNS-polimeráz, mind a naszcensz RNS lánc disszociál a DNS templátról - mint láttuk valószinűleg az RNS-polimeráz konformációs változásának következménye (54). Az I-es típusú terminátoroknál a disszociáció az RNS/DNS heteroduplex termodinamikai instabilitásának köszönhető. Ez egyrészt

az RNS/DNS hibrid szakasz (12±1 bp) terminátor RNS hajtűk miatti lerövidülésével, valamint a maradék rU-dA bázisok közötti gyenge kölcsönhatások következményeként értelmezhető folyamat (94).

A termináció alternatív modellje feltételezi, hogy az RNS/DNS hibrid szakasz lényegesen rövidebb, mint 12±1 bp (3 bp vagy még kevesebb) valamint, hogy a transzkriptum közvetlen RNS-fehérje kölcsönhatások révén kötődik az RNS-polimeráz egy meghatározott helyéhez. E modell szerint a termináció akkor következik be, ha az RNS hajtűképződés kiszorítja a transzkriptumot a kötőhelyéről (94 és hivatkozásai), mely a transzkripciós komplex átalakulásával és az RNS polimeráz/naszcensz RNS disszociációjával járna.

Egy mutáns ColE1 terminátor analízise (54) azt mutatta, hogy az RNS molekula az RNS-polimeráz disszociációja után kötve marad a templáthoz. Ez azt sugallja , hogy a disszociáció sorrendje: 1. RNS-polimeráz 2. naszcensz RNS. Egyelőre kérdéses, mennyire általános ez a mechanizmus a különböző organizmusokból származó és különböző regulációs egységekben működő terminátorok körében.

II.3.2. A Rho-dependens termináció mechanizmusa

A Rho proteint 1969-ben fedezték fel (146), mint egy olyan E. coli fehérjét, mely fokozza a transzkripció terminációját a lambda fág DNS-ének meghatározott helyein. A rho gén az E.coli kromoszóma 83. percéhez térképezhető (141) és egy bázikus 419 aminosavból álló fehérjét kódol, melynek molekulasúlya 46000 dalton (50,130). A Rho szerepét a terminációban különböző E. coliból és bakteriofágokból származó DNS templátokon mind in vitro, mind in vivo számos kísérleti adat bizonyítja (55,72,89,147). További in vivo bizonyítékkal

szolgálnak azok a genetikai munkák, melyekben a fehérje különböző mutánsait állították elő és jellemezték (144,35). Az utóbbi években vált ismertté a rho teljes nukleotidsorrendje (130), valamint sikerült előállítani olyan plazmidokat is, melyekkel a fehérje túltermeltethető (171).

A különböző kísérleti megközelítések adataiból az alább felsoroltak illeszthetők koherens képbe a Rho faktor hatásmechanizmusát illetően:

1. A lambda t_{R1}-et megelőző 80 bp szakasz esszenciális a Rho-dependens terminátor működéséhez. Ez a régió két nem transzlált, erős másodlagos szerkezeteket nem tartalmazó, pirimidin gazdag RNS elemet hordoz (rutA ill. rutB, 28).

2. A Rho protein terminációs hatásának kifejtéséhez nélkülözhetetlen ATP-áz aktivitással rendelkezik. Az ATP-áz aktivitás kofaktora C gazdag, struktúrálatlan RNS, mely nem kovalens úton kötődik a fehérjéhez (37,169).

3. Az RNS-polimeráz molekula időlegesen felfüggeszti a transzkripciót (pausing) és a naszcensz RNS meghatározott szakaszán vesztegel, mielőtt a Rho faktor terminációs hatását kifejti. A terminációs efficiencia és a veszteglés időtartama között nincs szoros összefüggés (97,118).

4. A Rho fehérje specifikusan kötődik egy 85 bp hosszú t_{R1} terminátorral végződő RNS-hez, mely a rutA és rutB elemeket tartalmazza (28).

5. A Rho két RNS kötőhelyet tartalmaz (a és b helyek), melyek egymást követően lépnek működésbe (142,143). Csak a második RNS kötőhely (b) működése indukálja a fehérje ATP-áz aktivitását. Az ATP hidrolízis nem foszforilált intermediereken keresztül folyik (105).

6. A Rho proteinnek két konformációs állapota létezik attól függően,

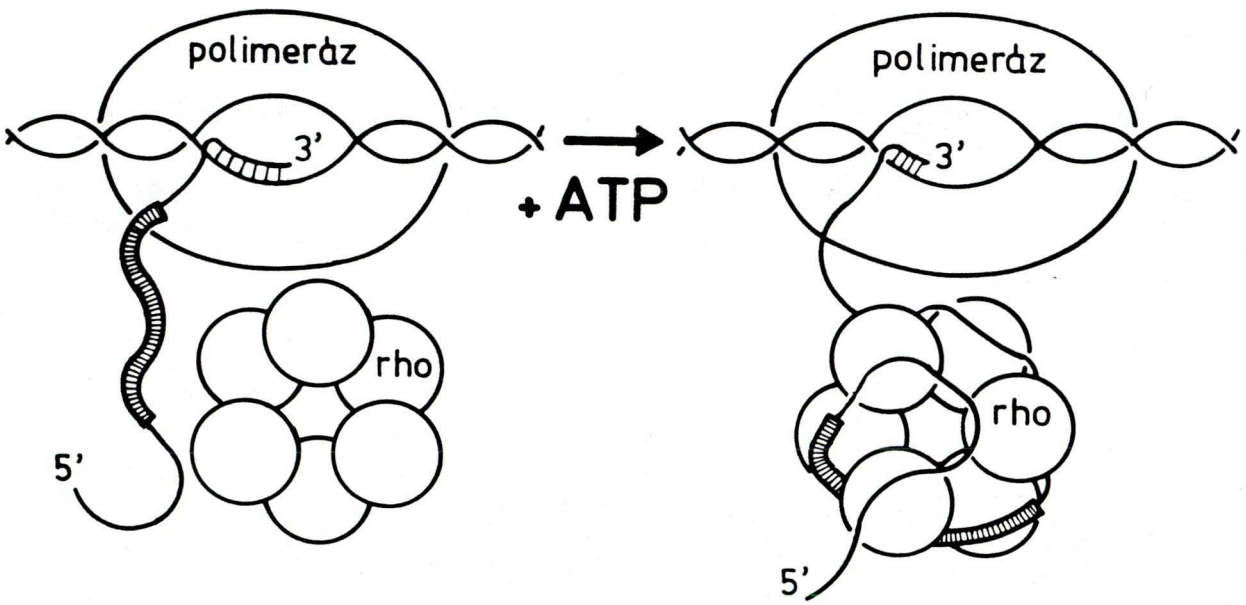
hogy ATP vagy ADP kötődik-e hozzá. Az ATP hidrolízis közben felszabaduló energiát - mely a további terminációs reakcióban használódik fel - az egyik konformációs intermedier tárolhatja.

7. A Rho egy ATP hidrolízist igénylő reakcióban felszabadítja az RNS láncot az RNS-polimeráz/RNS/DNS komplexből. Meglepő módon a Rho in vitro körülmények között szintén megkönnyítheti az RNS release-t az I-es típusú terminátoroknál is (pl. a t_a terminátornál a trp operonban, 56). A kísérletek azt mutatják, hogy a Rho rendelkezik egy olyan helikáz aktivitással, mely egy RNS 3' vég és a komplementer egyes szálú templát DNS hibridet széttekeri (21). A széttekerési reakció 5'-3' irányú és 5' irányban szabad rut szekvenciákat hordozó RNS-t valamint ATP hidrolízist igényel.

8. Bár kimutatták, hogy a Rho faktor és az RNS-polimeráz együttműködése terminációt okoz (37), a két fehérje között nem figyeltek meg közvetlen fizikai kölcsönhatást a reakció során.

A Rho hatásmechanizmusa a fenti megfigyelésekkel összhangban a következőkben összegezhető: a fehérje először az a. kötőhelyén keresztül riboszómáktól mentes RNS láncokat köt, majd a b. kötőhelyén keresztül specifikus kontaktust létesít az RNS lánc rut elemeivel. A pirimidinekben gazdag, kiterjedt másodlagos szerkezetekkel nem rendelkező RNS beindítja a Rho ATP-áz aktivitását. A keletkező ADP megváltoztatja a Rho konformációját, az ATP hidrolízis energiája ebben a konformációs intermedierben tárolódik. A felhalmozott energia a Rho protein transzlokációjában, majd az RNS-polimeráz/Rho (közvetett) kontaktus kialakításában és az RNS-polimeráz felszabadításában hasznosulhat. A Rho és az RNS-polimeráz kölcsönhatás kialakítása feltehetőleg a NusA fehérje egyidejű jelenlétét is igényli.

Az RNS-polimeráz - ahogyan azt már korábban láttuk - a Rho transzlokációja közben az általa felismert terminációs hely(ek) környékén vesztegel. A Rho faktor végül kitekeri az RNS/DNS hibrideket és így felszabadítja a kész RNS láncot. A reakció néhány fontos mozzanatát láthatjuk a 3. ábrán.



3. ábra. A Rho-dependens termináció modellje. Ha az RNS nem transzlált, a transzkriptum Rho felismerő helyei hozzáférhetőek a Rho protein számára, mely hexamer formájában kötődik az RNS-hez. Kötődés után valószinűleg a transzkriptum jelentős darabja tekeredik körül a hexameren és egyéb új kölcsönhatások is kialakulnak a másodlagos kötőhely környékén. A kötődés utáni nukleozid trifoszfát hidrolízis révén a Rho faktor katalizálja a kész transzkriptum disszociációját a templátról (57).

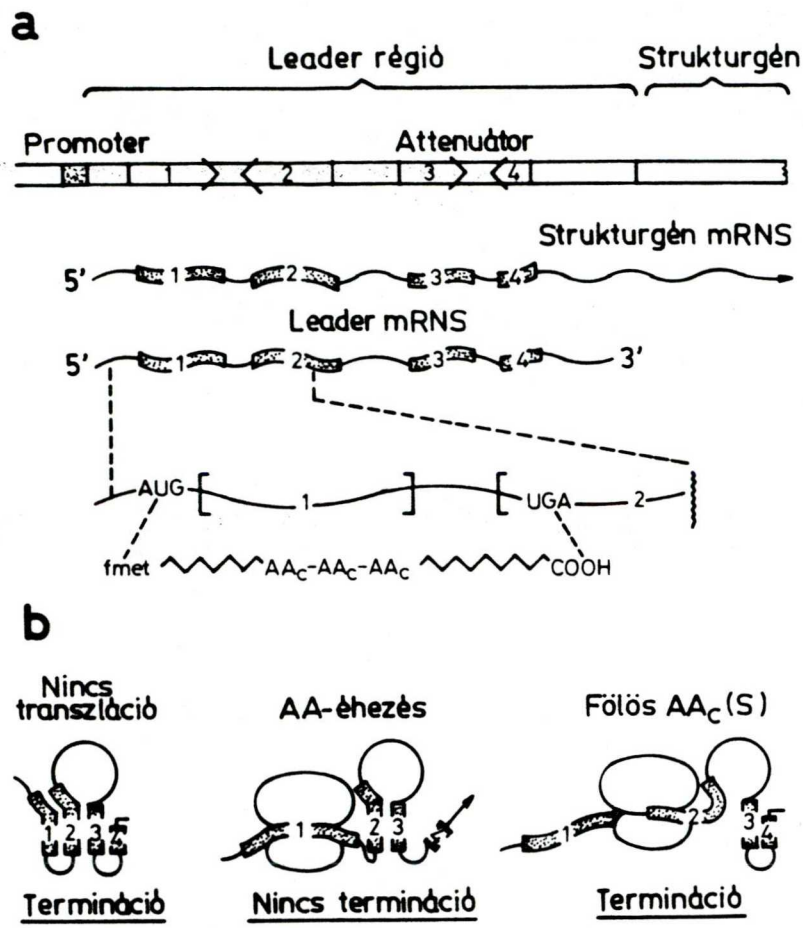
II.4. A transzkripciós terminación alapuló génszabályozási utak

Az előző fejezetekben áttekintettük azokat a cisz-regulátor elemeket, melyek kölcsönhatásba lépve az RNS-polimeráz molekulával a

transzkripció terminációját okozzák. Az alábbiakban olyan konkrét regulációs utakat ismerhetünk meg, melyekben a modulálható terminátorok játszanak kitüntetett szerepet. Ebbe a kategóriába a jelenlegi ismereteink szerint négyféle szabályozási mechanizmus sorolható: az antitermináció, az attenuáció, a polaritás valamint a retroreguláció. A terminációt meghatározó struktúrák hatékonyságát mindegyiknél fehérjefaktorok módosítják. A terminátorok több esetben kettős (szenzor-regulátor) funkciót látnak el és fontos anyagcsereutakat kapcsolhatnak ki vagy be a sejt adott metabolikus állapotának függvényében.

II.4.1. Attenuáció

Az E. coli és a S. typhimurium számos esetben modulálja génjeinek expresszióját az attenuációnak nevezett szabályozási mechanizmussal (6,84). Ebben a gének átírásáért felelős promóterrégió és az első struktúrgén közötti szakaszon lokalizálható terminátor játszik kitüntetett szerepet. A terminátor mögötti struktúrgén csak akkor fejeződik ki, ha a terminációs szignál inaktiválódik. A bakteriális attenuátoroknál mind I-es, mind II-es típusú terminátorokat azonosítottak már. Az attenuátoroknál megfigyelhető terminátor inaktiváció a transzláció és az RNS másodlagos szerkezet közötti kölcsönhatásokból adódik és számos esetben nem igényel más diffuzibilis faktorokat. Az attenuációs kontroll főleg a bioszintetikus és a katabolikus operonok regulációjában játszik jelentős szerepet. Egy általános attenuációs kontrollt szemléltet a 4. ábra.



4. ábra. Attenuáció az aminosav bioszintézis operonokbn. a. Egy tipikus operon felépítése, a struktúrgéneket megelőző kb. 200 bp hosszúságú leader régióval. A tükörszimmetrikus szakaszokat nyilak jelzik, ezek a transzkriptumon belül hajtűket képezhetnek. A leader peptid transzlációja a 2-es régióban fejeződik be, mely lehetővé teszi a 3:4-es RNS struktúra kialakulását, ezáltal a terminációt. b. Az aminosavéhezés, vagy a transzláció megszűnésének következményei. Ha a riboszómák aminosavéhezés következtében nem fedik le a 2-es régiót, a termináció nem következik be, mivel nincs lehetőség a 3:4-es hajtűképződésre (146).

Az első stuktúrgén előtti szakasz, az ún. leader RNS egy transzkripciós terminátort hordoz (ún. attenuátor) a leader 3' végén. Az attenuációs reguláció, - mely egy sejten belüli érzékelő mechanizmussal van összekötve - lehetővé teszi a terminátor

efficienciájának modulálását. Az összekapcsolt érzékelő-terminációs rendszer egy tükörszimmetrikus szakaszokat tartalmazó régión alapul, melyen belül a képződő RNS különböző hajtűszerkezet mintázatokat vehet fel. A legegyszerűbb esetben az attenuációban négy régió vesz részt (1,2,3 és 4-es régiók), melyek szekvenciájukból adódóan különböző alternatív hajtűszerkezeteket képezhetnek: az 1-es a 2-sel, a 2-es a 3-sal, a 3-as a 4-sel párosodhat (a 3:4-es hajtű a terminátor). A termináció vagy az RNS lánc elongációja annak a függvénye, hogy az RNS-en belül melyik struktúra alakul ki. Az 1:2-es hajtű és az azt megelőző leader RNS egy kismólsúlyú peptidet kódol. A leader peptid transzlációjában résztvevő riboszómák pozíciója viszont az a tényező, ami meghatározza, melyik alternatív RNS struktúra alakulhat ki. A peptid transzlációja közben a riboszómák lefedik az 1:2-es hajtűrégiót, így csak a 3:4-es stem and loop szerkezet alakulhat ki, mely végső soron terminációt (attenuációt) okoz. A trp operonban pl. az E. coli RNS-polimeráz az 1:2-es hajtűnél vesztegel, amit a NusA protein mint a további elongáció nemkompetitív inhibitora is elősegít (93). Az 1:2-es hajtű így a transzkripció és a transzláció szoros kapcsoltságát hozza létre, mely lehetővé teszi, hogy a leader peptidet transzláló riboszómák a veszteglő RNS-polimerázt utolérjék. A kapcsoltság megakadályozza, hogy az 1-es és 2-es szegmentek résztvegyenek akár az 1:2, akár a 2:3 hajtűstruktúrák kialakításában, így elősegíti a 3:4-es terminátorszerkezet képződését. Végső fokon tehát a leader peptid szekvenciája az a fő determináns, amely megszabja, hogy a lehetséges RNS másodlagos szerkezetek közül melyik jöjjön létre.

Az aminosavak bioszintetikus operonjaiban a leader peptid egy sorozat olyan aminosavat tartalmaz, melyet a regulált operon kódol. Ha

a sejtben a kódolt aminosav raktárai kimerültek, a riboszómák - töltött aminoacil-tRNS híján - az adott kodonoknál megállnak és így nem érik utol az RNS-polimerázt. Mindez a transzkripció és a transzláció szétkapcsolását okozva meggátolja a terminátorszerkezet kialakulását, mely az adott gén erőteljes transzkripciójában nyilvánul meg. Az attenuációs regulációt gyakran befolyásolják többszörös aminosavkódok, melyek a kritikus hajtűképzésre alkalmas RNS régiókra esnek. A his operonban a fent leírt szabályozási egységeken túl más bonyolult RNS struktúrák is kialakulhatnak a leader RNS-en belül (6). Az alternált RNS hajtűképző szakaszokon túl a his leader RNS egy másik szakasza olyan szerkezetet vehet fel, amely rendkívül hasonlít a $tRNS^{his}$ másodlagos struktúrájához, így $tRNS^{his}$ kötő fehérjék is befolyásolhatják működését.

Az attenuációs mechanizmus egy harmadik változatát írták le az E. coli pirimidin bioszintézis géneknél. Itt a sejten belüli UTP készletek kimerülése megkönnyíti az attenuátoron keresztül történő transzkripciót a pyrBI UTP bioszintetikus operonba (182). Ez a reguláció egy I-es típusú terminátort használ fel, mely a transzkripciós iniciációs ponttól kb. 120 bp-ra, az első struktúrgén előtt 23 bp-ra lokalizálható. A leader RNS egy olyan 44 aminosavas peptidet kódol, mely 3 bp-al az első struktúrgén transzlációs iniciációs kodonja előtt fejeződik be. A terminátor hajtűje előtt kb. 20 bp-nyira egy U-sorozat található a leader RNS-en belül. In vitro, UTP limitált reakciókörülmények között ez a szekvenciarész felfüggeszti a transzkripciót, mely az RNS-polimeráz és a leader peptidet transzláló riboszómák szoros kapcsoltságához vezet. Ennek eredménye az a terminátor rezisztens transzkripciós komplex, mely képes az attenuátor átírására. Fölös UTP jelenlétében az RNS-polimeráz

könnyen átírja a szenzor/regulátor U-sorozatot, így a riboszómák ezen a szakaszon nem érik utol a transzkripciós komplexet. A kapcsoltság megszünte után az RNS-polimeráz az attenuátor hajtűnél leáll, bekövetkezik a termináció.

Az attenuációs kontroll egy további variánsa regulálja az E. coli tna triptofán katabolikus operonját (178). Az operon egy kb. 300 bp-os leader RNS-t tartalmaz, melynek első egyharmada egy 24 aminosavas peptidet kódol, míg a maradék kétharmada számos II-es típusú Rho-dependens terminátort határoz meg. Rho^- baktériumokban a tna struktúrgének derepresszált állapotban vannak. Vad típusú sejtekben csupán a leader RNS-ek konstitutív szintézise folyik és triptofán hozzáadással indukálható az attenuátorok mögött elhelyezkedő triptofán katabolizmus géneket hordozó DNS átírása. Izoláltak cisz-domináns konstitutív tna mutánsokat is, melyek mind a leader RNS meghatározott szakaszára, az ún. boxA régióra estek. A feltételezések szerint triptofán hiányában a Rho-dependens terminátoroknál fellépő attenuáció a boxA cisz-elem, a NusA és Rho E. coli gazdafehérjék közreműködésével alakul ki. (Más rendszerekben a NusA fehérje és a boxA szekvencia kölcsönhatását már kimutatták.) A terminátorok triptofán jelenlétében történő átírásáért valószinűleg egy eddig még nem azonosított triptofán érzékeny antiterminációs fehérje a felelős. További adatok alapján a leader peptid AUG transzlációs iniciációs kodonjának helyspecifikus mutagenezissel történő megváltoztatása (AGC-re) felfüggeszti a Rho-dependens terminátorokon keresztüli transzkripciót, mely a leader peptid szintézis kritikus - bár eddig nem tisztázott - szerepére utal a folyamatban (178). A leader peptidet 25 bp-al meghosszabbító frameshift mutáció derepresszált operon működést eredményez, aminek valószinű oka a termináció felfüggesztése a

régióban. A transzláció kiterjesztése a tna leader egy hosszabb szakaszára a feltételezések szerint a Rho protein RNS kötését akadályozza meg.

II.4.2. Polaritás

A transzkripció és transzláció közötti szoros kapcsoltság prokarióta szervezetekben a polaritás kialakításában is fontos szerepet játszik, melynek során egy policisztronos mRNS-en belül a transzláció nonszensz kodonokkal, deléciókkal, frameshift mutációkkal vagy inszerciókkal történő felfüggesztése - és ezzel a transzkripció és transzláció szétkapcsolása - az érintett fehérje mögötti cisztronok expresszióját is erőteljesen redukálja vagy megszünteti. Szuppresszor mutációkat hordozó baktériumokban a polár hatást gyakran nem észleljük, mivel ezekben a törzsekben a mutáns fehérjék transzlációja a szuppresszorok révén többé-kevésbé megoldott. A jelenség magyarázatára feltételezték, hogy transzláció hiányában számos olyan látens terminátor válik aktívvá, melyeket az RNS-polimeráz (éppen a transzkripció és a transzláció szoros kapcsoltsága miatt) nem ismert fel (39,172).

A polaritás mechanizmusát magyarázó modellek két fő feltételezésből indulnak ki:

1. Az egyes operonok struktúrgénjein belül is találhatók Rho-dependens transzkripciós terminációs helyek.
2. Míg a mRNS transzlált, ezek a helyek nem hozzáférhetők a Rho protein számára, így a transzkripció terminációja sem következhet be (1).

A modellek helyességét alátámasztja a polár szupresszor mutánsok

egy olyan csoportjának felfedezése, melyek nem a transzlációt állítják helyre, hanem a Rho faktor tulajdonságait változtatják meg (90,141,144). A polár hatást nemcsak a Rho faktor mutációival, hanem más, az E coli bizonyos bakteriofágjai által kódolt fehérjefaktorokkal is szuppresszálható (pl. a lambda fág N és Q fehérjéivel, 2,51,52,64,184).

A Rho-dependens, polaritást okozó régiók és azok környékének nukleotidsorrendjét kevés esetben jellemezték részletesen. A S. typhimurium his operonjában közvetlenül egy polár hely előtt egy Tn10 transzpozon inszerciót írtak le (29). Az mRNS összetétele rendkívül hasonlít a trp t' Rho-dependens terminátorhoz: egy kb. 100 nukleotid hosszúságú szegment G-tartalma mindössze 15%, de a hozzá kapcsolódó rövid 30 bp-os szakasz már 50% G-t kódol (18).

Egy másik transzpozon, az IS2 - bár csak meghatározott orientációban működve - jelentősen csökkenti egy policisztronos messenger inszerció mögötti génjeinek expresszióját (39,158). Ez a hatás nyilvánvalóan az IS2-n belüli Rho-dependens terminátorokhoz rendelhető, mivel rho mutánsokkal a disztális gének expressziója helyreállítható (10,35). Az IS1 transzpozon inszerciója egy operonba szintén erőteljes polár hatást okoz, mely Rho-dependens terminációból ered (36). Más esetekben (pl. az IS4 inszerciós szekvenciánál) a polaritás mechanizmusa nem magyarázható teljes egészében a Rho-dependens terminációs helyek jelenlétével (10). Más kísérletekben egy lacZ génen belüli Rho-dependens terminátor részletes analízise rut szekvenciát derített fel a termináció helyét megelőző szakaszon (145).

Összegezve, a polaritás és a Rho-dependens termináció közötti kapcsolat feltételezi, hogy a transzlált génen belüli polaritást okozó hely a transzkriptum egy olyan szegmentje legyen, melynek magas az

affinitása a Rho proteinhez. Csak a transzkripció és a transzláció szétkapcsolásával válnak hozzáférhetővé a veszteglő RNS-polimeráztól megfelelő távolságra levő Rho kötőhelyek (rut szekvenciák). A kötődés után a Rho faktor a már ismertetett módon idézi elő a transzkripció terminációját.

A fenti adatokból valószinűnek látszik, hogy a polaritás molekuláris mechanizmusának teljes tisztázása a nem túl távoli jövőben bekövetkezhet.

II.4.3. Antiterminációó

Mind az attenuáció, mind a polaritás esetében a riboszómák függesztik fel a termináció folyamatát. Az első esetben közvetett úton, az RNS-RNS kölcsönhatások módosításával meggátolják egy I-es típusú terminátorstruktúra kialakulását, míg a második esetben valószinűleg lefedik a transzkriptum rut régióit és lehetetlenné teszik a Rho potein megkötését. Ebben az értelemben a riboszóma egy antiterminációs faktornak is tekinthető, hasonlóan bármely más, a terminációs szignálok felismerését gátló fehérjével együtt.

A legjobban felderített antiterminációs mechanizmus a lambda fág korai és késői génjeinek transzkripcióját szabályozza. A két fő azonosított antiterminációs faktor a fág N és Q génjeinek terméke (51,64), melyek működése megszabja, hogy a lambda életciklusának lítikus vagy lizogén szakasza érvényesüljön-e a fágszaporodás során (72).

Az N protein lehetővé teszi I-es és II-es típusú terminátorok átírását is, ami azt jelzi, hogy az N fehérje függő antitermináció nem egyszerűen a Rho faktor inaktiválásának következménye (61). Másodszor,

a terminációszuppressziója csak a p_L és p_R promóterekről átíródó transzkriptumokon következik be és a promóterekhez közeli, - de azoktól független - az N működéséhez esszenciális szekvenciákat, az ún. nut helyeket (N utilisation site) igényli (2,40). A nut szekvenciák részletes molekuláris analízise tükörszimmetrikus szakaszokat (boxB) és hozzájuk közeli szekvenciarészleteket (boxA) azonosított, melyek az antiterminációs hatás kifejtésében döntő szerepet játszanak (43,160). Az utóbbi években derült fény arra, hogy jónéhány lambdoid fág, sőt az E. coli számos operonja nagyon hasonló antiterminációs szekvenciákat tartalmaz (54). Az ismert nut helyek összehasonlításából konszenzus szekvenciák is ismertté váltak, pl. a boxA esetében (lásd 5. ábra).

		BoxA BoxB
lambda	nutL	CGCTCTTAAAAATTAAGCCCTGAAGAGGGCA
lambda	nutR	CGCTCTTACACATTCCAGCCCTGAAAAAGGGCA
21	nutL	GGCTCTTTAACATCGACGGACTCTCAACCTAACCGTTGAGA
21	nutR	TGCTCTTTAACAGTTCTGGCCTTTCACCTCTAACCGGGTGG
P22	nutL	CGCTCTTTAACTTCGATGATGCGCTGACAAAGCGC
P22	nutR	CGCTCTTTACCAATCTGAACCGCCGACAACGCGGT
PH180	nutL	TGCTTTTTAACAACATGCAGCTTTACAGCGTCAATGACCTGTTAAGACCCCTACACGTAAACGTG
HK022	nutL	TGCTTTTAGTCACAAAAAGCAAAGCAGCTTTTTG
lambda	qut	CGCTCGTTGTGGTAGTGAGATGAAAAGAGGCGGCGCTTACTACCGATCCGCCTAGTTGGTCACT
rrn antiterminátor		5' GCCGCGCCGCTGAGAAAAAGCGAAGCGGCACTGCTCTTTAA TGCTCTTTAA 3'
konszenzus BoxA		CGCTCTTTA
tna attenuátor		CGCCCTTGA

5. ábra A rokon nut szekvenciák összehasonlítása. Az ábrán a különböző lambdoid fágok ismert nut régióin kívül a nut-motívumokhoz rendkívül hasonló qut helyet, az rrn operonok leader szakaszának nut-rokon elemeit, a konszenzus BoxA szekvenciát, valamint a tna attenuátor régió BoxA homológ szakaszát tüntettük fel. A BoxA szekvenciákat aláhúzással jelöltük, a tükörszimmetrikus BoxB motívumokat megszakított aláhúzás jelzi.

Az N fehérje jelenlegi ismereteink szerint közvetlenül a nut helyeket átíró RNS-polimeráz molekulákra hat, működését úgy változtatva meg, hogy a régiótól disztális terminációs szignálokat az már nem ismeri fel (1). Az E. coli egyik fehérjéje - a NusA - erősen kötődik az N proteinhez és az antiterminációs hatás kifejtésében nélkülözhetetlen (54 és hivatkozásai). Az a megfigyelés, hogy az N fehérje okozta antitermináció csupán S100 extraktot tartalmazó redszerben is kiváltható, azt mutatta, hogy az RNS transzlációja nem szükséges az N protein működéséhez (81). Sőt a későbbi adatok egyértelműen bizonyították, hogy a nut helyek transzlációja az antitermináció megszűnéséhez vezet (193).

A Q protein működésének in vivo analízise tulajdonságaiban és faktorigényében a fent leírtakhoz hasonló antiterminációs rendszer jelenlétére mutatott (51). Az N fehérjétől eltérően azonban - melynek működését még in vitro nem igazolták - a Q protein RNS-polimerázt, a lambda 6S transzkriptumot kódoló DNS templátot, Q proteint és NusA-t tartalmazó tisztított rendszerben is kifejti antiterminációs hatását (63). A Q antiterminációs rendszer cisz-eleme az ún. qut (Q utilisation) szekvencia, mely felépítésében rendkívül hasonló a már ismertetett nut helyekhez: tartalmazza mind a boxA, mind a boxB modulokat. Ezek az elemek azonban - eltérően az N antiterminációs rendszertől - nem függetlenek az előttük elhelyezkedő p_R, promótertől, attól génsebészeti eszközökkel nem választhatók el (62,63).

A lambda N működésnek az E. coliban számos esszenciális gazdafehérjéjét azonosították már (54). Ezek közé tartozik a NusA és a NusB protein, de úgy látszik, hogy az S10 riboszómális fehérjét kódoló nusE lokusz is szükséges az N protein okozta antiterminációhoz. Hasonló adatok vannak az L11 riboszómális fehérjére vonatkozóan is (184).

Az még ma sem tisztázott, hogy a riboszómális fehérjék az antiterminációmely lépésében játszanak kitüntetett szerepet és hogyan fejtik ki hatásukat.

Általánosságban tekintve az antiterminációs mechanizmusok specifikus cisz-szekvenciákat igényelnek (pl. nut és qut helyek), ahol az RNS-polimeráz molekulák termináció rezisztenssé válnak és a disztális terminátorszignálokat nem ismerik fel. Az még nem teljesen tisztázott, hogy ez a fajta rezisztencia az RNS-polimeráz más fehérje által stimulált konformációs változásából, vagy egy faktor elongációs komplexhez való közvetlen kapcsolódásából adódik-e. Valószinű, hogy mind a két feltételezés igaz a faktor dependens antiterminációt illetően.

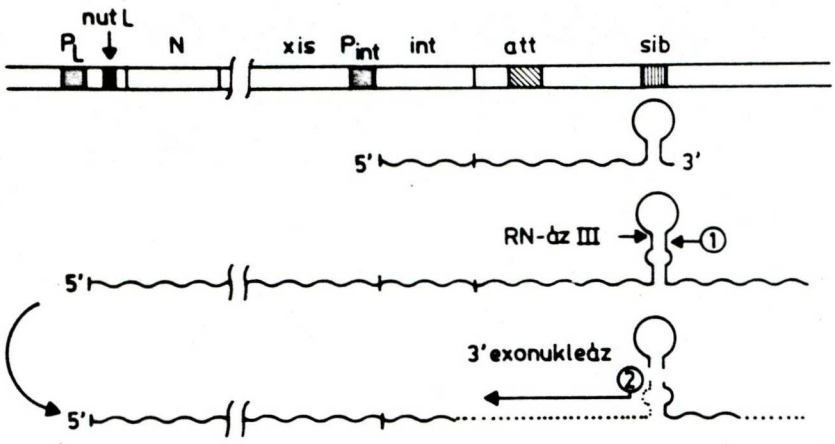
Mindezek mellett meg kell jegyeznünk, hogy nem minden terminációs szignált képesek átírni a megismert antiterminációs rendszerek. A lambda fág b2 régiójában például számos olyan terminátort találunk, melyek működését sem az N, sem a Q protein okozta antitermináció nem függeszti fel (26,66). Így a terminátorok egy másik fontos sajátságának tekinthetjük - faktorigényükön túl - azt a tulajdonságukat, hogy képesek-e az antiterminált transzkripció blokkolására. Az ilyen fajta terminációs helyek bár ritkán fordulnak elő, kitüntetett jelentőséggel bírnak a tanszkripciós regulációs folyamatok szempontjából azokban az operonokban, ahol az antitermináció a fő regulációs mechanizmus (136).

II.4.4. Retroreguláció és processzing

A feedback regulációt felhasználó kontrollok számos biológiai

rendszerben rendkívüli jelentőséggel bírnak, melynek klasszikus példájaként említhető egy bioszintetikus út első enzimének végtermékgátlása és/vagy a transzkripció operátor-represszor regulációja egy anyagcsereintermedier közreműködésével. Az attenuációs szabályozás ismertetésénél láthattuk, hogy egy specifikus helyen - a promóter és az első struktúrgén között - feedback mechanizmus kontrollálja a transzkripció terminációját és szabályozza egyben az attenuátor mögötti gének kifejeződését. A közelmúlt kutatásai derítettek fényt egy rendkívül érdekes génexpressziós kontrollra, melyből kiderült, hogy egy terminátor működésének módosítása a terminátor előtti, már átírt gének expresszióját is befolyásolhatja. A jelenségre a retroreguláció elnevezés terjedt el a tudományos köztudatban (136).

A lambda bakteriofágban számos, az integráz aktivitást érintő mutáció a lambda kromoszóma b régiójába térképezhető, mely néhány száz bázispárral az int gén mögött helyezkedik el. Ezek a mutációk egy sib néven jelzett (site of inhibition) regulációs elem határait jelölik ki, mely cisz elrendezésben működik és DNS-e nem kódol fehérjét. A sib elem gátló működését inaktiváló pontmutációk pontos behatárolása és más bizonyítékok is arra mutattak, hogy a sib^+ hatását poszttranszkripcionálisan fejti ki, minden valószinűség szerint az effektíven transzlálódó integráz mRNS mennyiségét változtatva (67,165). A retroreguláció feltételezett mechanizmusát a 6. ábra szemlélteti, mely az int expresszió két lehetséges módját mutatja be. Olyan körülmények között, mely a fáglizogenizációjának kedvez, az integráz fehérjére viszonylag nagy mennyiségben van szükség, míg a lambda genomot az E. coli kromoszómáról kihasító xis géntermék -



6. ábra. Az ábra a lambda DNS p_L promóter környéki szerveződését mutatja, a p_L és p_{int} promóterről történő transzkripciós iniciáció következményeivel együtt. Az előbbi esetben az N protein meggátolja a terminációt a sib régióban, ami az így képződött hosszabb transzkriptum RN-áz III hasításához és gyors 3' exonukleolitikus lebontásához vezet. Egyéb magyarázat a szövegben.

melynek génje közvetlenül az int előtt található - szintje alacsony kell hogy maradjon. Az alacsony xis géntermék biztosítja, hogy a fág integrációja után a lambda genom benn is maradjon a baktérium kromoszómáján. Az int gén transzkripcióját az int promoternél a cII géntermék pozitív aktivációja indítja el. Az int promóter közvetlenül az int gén előtt lokalizálható és részlegesen átfed a xis gén 3' végi szekvenciáival. A transzkripció az int gén mögötti szakaszon az attachment helyen keresztül (att) egészen a fággenom b régiójáig folytatódik. Körülbelül 150 bp-al az att régió középpontjától egy GC gazdag tükörszimmetrikus szakasz található, melyet egy U-kódoló régió követ. Ez a tipikus I-es típusú terminátor állítja le az int promóterről induló transzkripciót.

A fág lítikus ciklusa alatt egy másik transzkripciós útvonalat használ. Ekkor a transzkripció a p_L promóterről indulva átírja az N gént, majd a nutL régiót, ahol az N protein az RNS-polimeráz molekulát termináció rezisztens konformációba hozza. A megváltozott elongációs

komplex átírja a fággenom korai régióit (xis, int gének, att hely) és folytatja a transzkripciót a lambda b régiójába. Itt a potenciális I-es típusú terminátorhoz (sib) érve az elongációs komplex megváltozott tulajdonságai miatt a termináció nem következik be és az átírás a sib mögötti régiókban is folytatódik. Ezek a szakaszok meglepő módon egy RN-áz III felismerő hely kialakulását teszik lehetővé, melynek felső része megegyezik az int promóterről induló transzkriptum 3' végénél kialakuló hajtűszerkezettel. Csak a p_L promóterről induló transzkriptum esetében alakul ki az RN-áz III felismerőhely és történik meg az RN-áz III hasítás, mely az int mRNS instabilitásához vezet.

A közelmúltban elvégzett kísérletek azt mutatják, hogy a sib hely más gének mögé beültetve azok expresszióját is csökkenti (154). A fentiekkel összhangban ezek az adatok a következő modellt támasztják alá: az RN-áz III hasítás után a 3' végi hajtűstruktúrát már nem tartalmazó int mRNS rendkívül érzékennyé válik a 3' exonukleázok degradációval szemben. Ez egyben jelentősen csökkenti a p_L promóter indította transzkriptumról képződő integráz mennyiségét. Bár eddig még nem találtak a degradációs folyamatokért felelős specifikus ribonukleázt, a legvalószinűbb jelölt az RN-áz II, mely rendkívül gyorsan emészti a mRNS molekulákat mindaddig, míg egy erőteljes másodlagos struktúra (általában hajtűszerkezet) a működését le nem állítja. Ebből az is világosan látszik, hogy a stem and loop struktúra megléte nemcsak a terminációs esemény szempontjából, hanem a képződött mRNS stabilitásának fenntartása miatt is fontos (136).

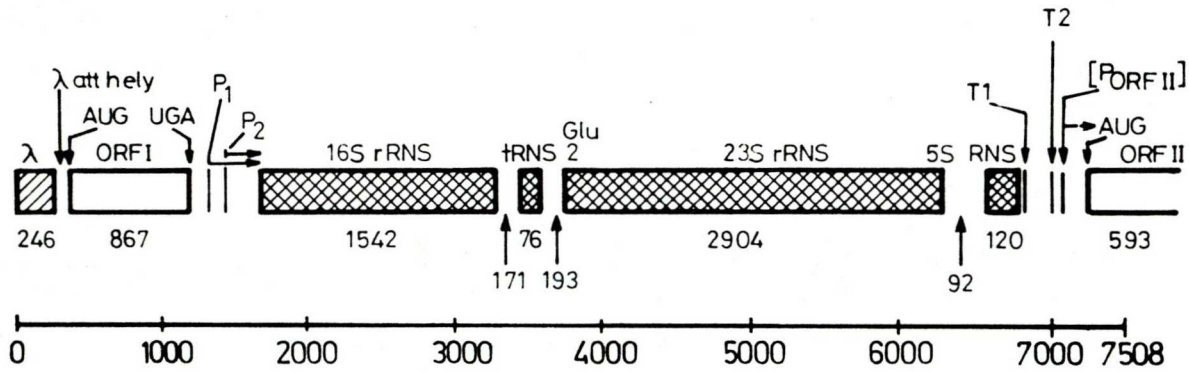
II.5. A riboszómális RNS (rrn) operonok transzkripciós szabályozása

A bakteriális riboszómális RNS (rrn) operonokban a képződő géntermék rendkívül hosszú (kb. 7000 bp), nem transzlált, és kiterjedt másodlagos szerkezeteket tartalmazó RNS lánc, mely a fenti tulajdonságai ellenére az elejétől a végéig megszakítás nélkül íródik át (115). A jelenség eléggé meglepő, mivel az attenuációról és főleg a polaritásról szerzett ismereteink alapján jogosan feltételezhető, hogy a transzláció és a transzkipció szoros kapcsoltsága az a mechanizmus, mely megvédi az RNS láncok szintézisét az idő előtti terminációtól (1). Ez a tény a priori egyfajta - az rrn operonokhoz társult - antiterminációs mechanizmus létezésére utal, mely az átlagos RNS populációnál jóval hosszabb és struktúráltabb transzkriptumok átírását biztosítja. Ha I-es, vagy II-es típusú terminátorokat építünk be az rrn promóter-leader régió mögé (mely terminátorok egyébként 90% körüli polaritást okoznak, ha a transzkripció a lac, vagy az ara promóterről indul) polár hatás nem, vagy csak alig mutatható ki (4,173). Az antiterminációs effektus deléciós téképezések alapján a riboszómális leader egy 67 bp-os szakaszához rendelhető és más promóterekre is átvihető (75,102). A 67 bp-os leader DNS-ét a lac promóterhez fúzionálva a promóterről induló transzkripció átírja a disztális terminátorokat. Bár az antiterminációs hatáshoz bizonyos kísérletek eredményei szerint maguk a riboszómális promóterek is hozzájárulnak (74,75), ennek a feltételezésnek az igazolása még további megerősítést igényel. Helyspecifikus mutagenezissel az rrn leader szakaszán a lambda fág antiterminációjában résztvevő cisz szabályozóelemekkel (a nut régióval) rokon szekvenciákat mutattak ki. Ezek a régiók hasonlóak a lambda boxA illetve boxB moduljaihoz és szerepük a riboszómális

operonok transzkripciójában egyértelműen bizonyított. Az rrn operonokban működő antiterminációs mechanizmus azonban lényeges eltéréseket is mutat a lambda (és lambdoid fágok) antiterminációjától: míg a lambda nut régiójában a cisz-elemek sorrendje boxA-boxB-boxC, az rrn operonokban ugyanez boxB-boxA-boxC elrendeződést mutat (102). Ugyancsak más a két antiterminációs rendszer faktorigénye is: míg a lambda fág esetében a termináció rezisztens elongációs komplex kialakításában a NusA, de főleg a fág által kódolt N fehérje esszenciális, az rrn operonok átírásában ez utóbbi bizonyosan nem vesz részt. Az antiterminált elongációs komplex a jelenlegi felfogás alapján a boxB-boxA-boxC régióban két E. coli fehérje, a NusA és NusB közreműködésével alakul ki (102,115). Hogy az RNS-polimeráz konformációváltozásában van-e szerepe valamely a lambda fág N fehérjéjével rokon E. coli proteinnek, azt további kísérletek hivatottak eldönteni. Ugyancsak érdekes kérdés, hogyan áll le az antiterminált transzkripció az egyes rrn operonok végén. Szintén a priori feltételezések alapján a riboszómális RNS-ek 3' végét speciális transzkripciós terminátorok zárják le, melyek képesek az antiterminált transzkripció blokkolására. Számos kísérleti adat mutat abba az irányba, hogy ez a feltételezés valóban jogos, azonban olyan speciális terminátorsajátságokat, melyek a "szuperterminátor" tulajdonságokért lehetnének felelősek mindeddig nem sikerült találni. Valószínű, hogy ebben az esetben is a magasabbrendű RNS struktúra (138,139,164) tanulmányozása hozhatja meg a választ a ma még tisztázatlan kérdésekre.

II.6. Kísérleti rendszerünk, az rrnB riboszómális RNS operon komplex transzkripciós terminátorrégiójának jellemzése

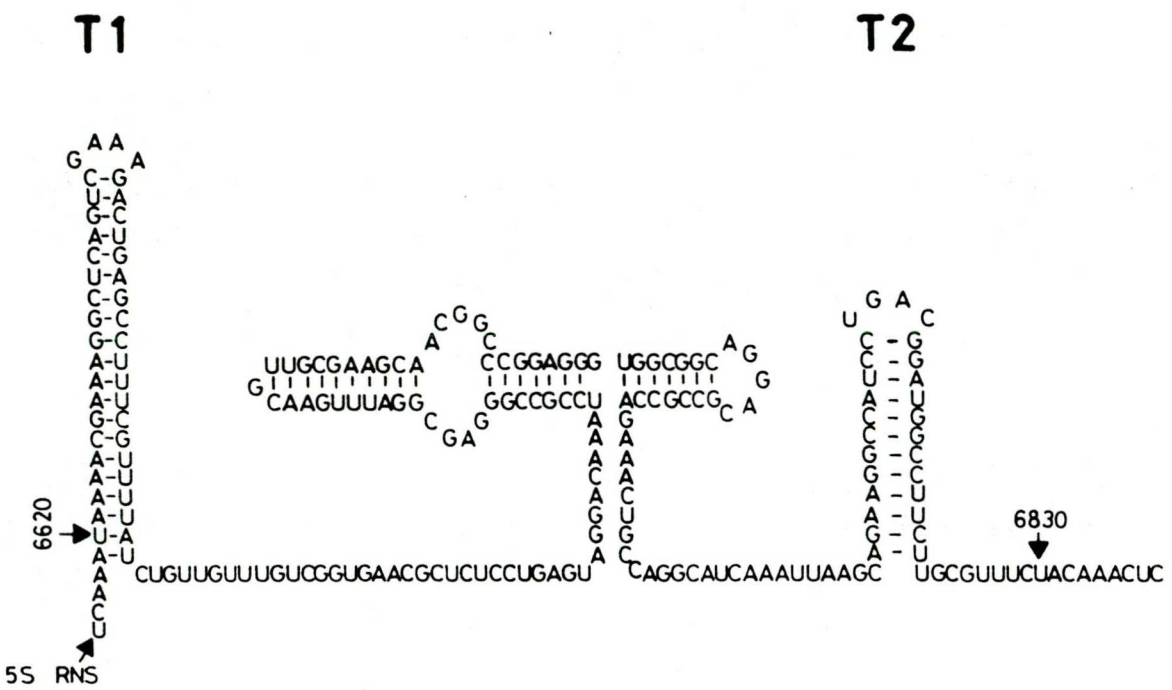
A laboratóriumunkban kísérleti objektumként használt rrnB operon - mely az E. coli hét riboszómális RNS operonjának egyike - fizikai térképét több restrikciós enzimre meghatározták már (13,16) valamint teljes nukleotidsorrendje is jóideje ismert (25). Az operon felépítését a lambda rif^{d}18 transzdukáló fágban az alábbi sematikus ábra szemlélteti:



7. ábra. Génorganizáció az rrnB operonban. A satírozott rész a lambda rif^{d}18-ból származik. Az üres téglalapokal jelzett szakaszok két fehérjekódolásra alkalmas szekvenciát reprezentálnak a transzlációs kódokkal együtt. (AUG,UGA) A kettősen satírozott téglalapok a riboszómális RNS struktúrgének, a közöttük lévő tRNS$_2^{Glu}$-al. A P1 és P2 az rRNS gének promótereit, T1 és T2 ugyanezek terminátorait jelöli. A P_{ORFII} a második, fehérjeszintézisre elvileg alkalmas gén promótere. Az ábra alatti számok az egyes szakaszok nukleotidban mért hosszát adják meg.

A többi riboszómális RNS-t kódoló rrn gén is alapvetően igen hasonló felépítést mutat. Ezidáig hat operon, az rrnB (25), rrnC (192), rrnD (45), rrnE (103), rrnG (168), rrnH (166) 3' végi régiójának nukleotidsorrendjét határozták meg. Mindegyik transzkripciós egység végén faktor independens, I-es típusú terminátor

lokalizálható. Egyedüli kivételt az rrnB operon képez (25), melynek terminátorrégiója kiterjedt és komplex. Itt a stabil RNS-ek génjei mögött két faktor independens terminátort találunk, egyet (T1) közvetlenül az 5S RNS génje mögött, a másikat (T2) mintegy 130 bp-ra a T1 terminátor 3' végétől. A két terminátor meglehetősen nagyfokú homológiát mutat más rrn operonok transzkripciós terminátoraival (103). A T1 és T2 között két termodinamikailag stabil inverted repeat (fordított ismétlődés) struktúra (IR1,IR2) van, melyek a feltételezések szerint nem képesek terminációra, mivel az I-es típusú terminátorokra jellemző U-sorozat mindkettőnél hiányzik. A fentieken kívül még két direkt repeat szerkezet is lokalizálható ebben a régióban, melyek közül az első nagyrészt az 5S RNS génen belül (6603-6620 bp pozícióig, 25), a másik közvetlenül a T2-es terminátor előtt helyezkedik el. (6771-6788 bp pozíciók) A direkt repeatek jelenléte a hipotézisek szerint egy olyan transzpozíciós eseményre utal, mellyel a T1 terminátor épült volna be az 5S RNS génje és a T2 közé. A terminátorok és közvetlen környezetük nukleotidsorrendjét egy lehetséges RNS másodlagos szerkezetbe felrajzolva a 8. ábra szemlélteti.



8. ábra. Az rrnB operon végén lévő két terminátor (T1 ill. T2) nukleotidsorrendje egy lehetséges másodlagos szerkezetbe felrajzolva. A terminátorok közötti két hajtű inverted repeat szekvenciákat jelöl (IR1 és IR2). A rajzon az RNS szekvenciáját tüntettük fel.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Bár az rrnB gén teljes nukleotidsorrendjét már 1981 óta ismerjük és az operon kiterjedt kettős terminátort (T1,T2) tartalmazó 3' végi szakasza számos közismert plazmidvektor alkotórésze (lásd pl. 23,24), a terminátorrégió részletes molekuláris analízise mind a mai napig nem történt meg. Szórványos in vitro és in vivo irodalmi adatok főleg T1-et illetően állnak rendelkezésre (5,47,162,174). Jóval kevesebbet tudunk a T2 terminátor működéséről, a terminátorok közötti inverted repeat-ek (IR1,IR2) fukciójáról pedig semmiféle ismerettel nem rendelkezünk. Így a fenti adatok birtokában és a laboratóriumunkban rendelkezésre álló plazmidkonstrukciókból kiindulva célul tűztük ki a komplex, soktagú cisz-szabályozóelem részletes molekuláris analízisét. Munkánk során különösen a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen önálló terminációs efficienciával rendelkeznek a komplex rrnB terminátorszakasz egyes szubrégiói?
2. Van-e kölcsönhatás - és ha igen, milyen módon - az egyes elemek működésében a transzkripciós terminációs folyamat során?
3. Milyen hatékonysággal működnek a terminátorok fordított orientációban?
4. Hogyan befolyásolják a transzlációs hatások a terminátorok efficienciáját?

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. A kísérleti munka során felhasznált vegyszerek, preparátumok, izotópok, és baktériumtörzsek ismertetése

IV.1.1. Baktériumtörzsek és plazmidok

Minden kísérletet az E. coli C600*galK*$^-$ törzs felhasználásával (F^-, *galK*, *lacY*1, *thr*1, *leu*B6, *thi*1, *ton*A21, *sup*E44, 83) végeztünk el. Ugyanezt a baktériumtörzset alkalmaztuk az egyes plazmidkonstrukciók fenntartására és szaporítására is.

E.coli pazmidok:

Név	Szelektálható markerek	Irodalmi hivatkozás
pKL300	Ap^R, *galK*$^+$	McKenney és mtsai (114)
p20418-23	Ap^R	Boros és mtsai (15)
pBR322	Ap^R, Tc^R	Bolivar és mtsai (12), Sutcliffe (179)
pHC314	Ap^R	Boros és mtsai (17)

IV.1.2. Táptalajok és antibiotikumok

Az E. coli baktériumokat YTB, YTA, SOB, SOC valamint galaktózzal kiegészítet McConkey agar táptalajon tenyésztettük (69,110). Az egyes táptalajok összetétele a következő volt (1 l-re számított mennyiségek):

YTB

Bacto-tryptone (Difco vagy Merck)	10g
Bacto-yeast Extract (Difco vagy Merck)	5 g
NaCl	5 g

A pH-t NaOH-val 7,5-re állítottuk

YTA

összetétele megegyezik az YTB táptalajéval, azonkívül még 1.5% agart (Difco vagy Oxoid) tartalmaz.

SOB

Bacto tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 mM
KCl	5 mM

Sterilezés után a tápfolyadékot 20 mM Mg^{2+}-al (10 mM $MgCl_2$ + 10 mM $MgSO_4$) egészítettük ki.

SOC

SOB + 20 mM glükóz

Galaktózos McConkey agar

McConkey agar	50 g
Galaktóz	10 g

Az antibiotikumokat a következő koncentrációban használtuk (110):

Ampicillin (Pharmachim)	100 µg/ml
Tetraciklin (Sigma)	12,5 µg/ml

IV.1.3. Restrikciós enzimek és a molekuláris klónozásban alkalmazott egyéb enzimpreparátumok

A BstNI és DdeI enzimeket a New England Biolabs-tól vásároltuk. A molekuláris klónozási kísérletekben felhasznált többi restrikciós enzimet a Biokémia Intézet dolgozói állították elő. A restrikciós emésztések során a New England Biolabs Katalógus (120) által megadott körülményeket tekintettük irányadóknak.

A kísérletek során felhasznált egyéb enzimpreparátumok közül a Klenow-polimeráz Boehringer vagy New England Biolabs, a T4 polinukleotid kináz New England Biolabs, a T4 polinukleotid ligáz Boehringer vagy New England Biolabs készítmény volt. Alkalmanként a fenti enzimek házi preparátumait is felhasználtuk.

A további enzimek közül a Bal31 nukleáz a New England Biolabs, az S1 nukleáz Sigma, a Proteináz K Merck, a lizozim Serva és Reanal, a pankreász RN-áz Reanal készítmény volt. A restrikciós emésztésekben nukleázmentes BSA (Sigma Type V) preparátumot használtunk.

IV.1.4. Vegyszerek és izotópok

A munka során felhasznált vegyszerek alt. minőségű, kereskedelmi forgalomban beszerezhető Reanal, Sigma, Merck, Aldrich, Eastman Kodak és Amersham készítmények voltak. A szintetikus linkereket a New England Biolabs-tól vásároltuk. A radioaktív jelölésekre használt (α^{32}P)ATP, (γ^{32}P)dATP és (α^{32}P)dCTP az MTA SZBK Izotóp Intézetének munkatársai,a Magyar Izotóp Intézet vagy az Amersham által előállított termékek voltak. A készítmények specifikus aktivitása 37-110 TBq/nmol (1000-3000 Ci/mmol) volt.

Az in vivo galaktokináz aktivitásmérésekben felhasznált ^{14}C-U-galaktózt a Chemapol cégtől (Cseh és Szlovák Köztársaság) szereztük be.

IV.2. A kísérleti módszerek leírása

IV.2.1. Plazmid DNS izolálása

A kísérletes munkában alkalmazott plazmidok mindegyike relaxált replikációjú, ColE1 típusú plazmid volt (30). A plazmidok izolálására általában kétféle módszert használtunk:

- Kálium-acetátos kicsapás lúgos közegből (11)

Ezt az eljárást többnyire a rekombináns klónok gyors azonosítására használtuk, mivel rövid idő alatt nagyszámú, restrikciós térképezésre alkalmas plazmid DNS nyerhető a segítségével.

A plazmidok preparálásához 2 ml, legalább 9-10 órán át növesztett (ún. overnight) baktériumkultúrákat használtunk fel. Az eljárás hat fő lépésre bontható, ezek a következők:

- a sejtfal emésztése lizozimmal izotóniás, lúgos közegben
- a sejtek lízise erősen lúgos közegben (0.6% SDS, 0.12 N NaOH)
- a kromoszómális DNS és a fehérjék kicsapása a pH változtatásával (1.6 M K-ac.)
- a maradék fehérjék eltávolítása fenol-kloroformos extrakcióval
- a plazmid DNS és az RNS kicsapása 2 tf. 96%-os EtOH-val
- RNS mentesítés 20 μg/ml RN-ázzal

-Clear lizátum módszere

A Clewell és Helinski (30) által kidolgozott módszert általában preparatív mennyiségű plazmid DNS előállítására használtuk. Az eljárás

során az eredeti közleményben leírt tisztítási lépéseken nem változtattunk.

Szükség esetén a preparátumokat Sephacryl S-1000 oszlopon 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl pufferben gélszűréssel tisztítottuk.

IV.2.2. Fizikai térképezés

Mivel munkánk célja nem elsődlegesen fizikai térképezés volt, a módszer részletes ismertetésétől eltekintve csupán annak fő elveit vesszük sorra.

Számos olyan stratégia ismeretes, melynek alkalmazásával a rekombináns DNS-en belüli restrikciós enzim hasítóhelyek lokalizálhatók (110 és hivatkozásai). Általában ahhoz, hogy eléggé pontos és részletes restrikciós térképek álljanak a rendelkezésünkre több módszer felhasználása szükséges. Restrikciós hasítóhelyek lokalizálására, plazmidvektorokba beépült fragmentumok orientációjának meghatározására a következő általánosan használt térképezési módszereket alkalmaztuk:

- DNS minták emésztése egyetlen restrikciós endonukleázzal, majd a keletkező fragmentumok molekulatömegének meghatározása
- a preparátumok egyidejű emésztése két vagy több restrikciós enzimmel, a hasítási termékek azonosítása
- izolált fragmentum további emésztése a DNS-en hasítóhellyel rendelkező más restrikciós enzimmel
- egyik végén radioaktívan jelölt, vagy jelöletlen DNS parciális emésztése (176)
- exonukleáz kezelést követő restrikciós emésztés alkalmazása (101)

A fenti irányelvek mellett a vizsgált DNS molekula sajátos

tulajdonságai (pl. a lambda DNS esetében a hőkezeléssel elválasztható ragadós végek) sok esetben megkönnyíthetik a restrikciós térképek szerkesztését.

IV.2.3. Restrikciós fragmentumok elválasztása gélelektroforézissel

A különböző hosszúságú DNS fragmentumok elválasztására, az egyes fragmentumok izolálására méretüknek megfelelően agaróz, vagy poliakrilamid gélelektroforézist használtunk.

Nagyobb DNS fragmentumokat (0.3-30 kb) 0.7-2.5%-os agaróz géleken (Sigma HGT Type V) 50 mM Tris-HCl, 20 mM Na-acetát (pH 8.05), 2 mM EDTA összetételű pufferben, horizontális elrendezésben , 6-10 V/cm feszültséggel futattunk (71). A 20-500 bp-os DNS fragmentumokat 4-12%-os poliakrilamid gélen választottuk el (111). A futtató puffer összetétele 90 mM Tris-borát (pH 8.3) , 2.5 mM EDTA volt. (TEB puffer) A poliakrilamid géleket 40% akrilamid és 2% biszakrilamid törzsoldat megfelelő mennyiségeinek összemérésével, 0.1% APS és 0.002% TEMED segítségével polimerizáltattuk. Az agarózgéleken futtatott fragmentumokat a gélbe vitt 0.5 μg/ml töménységű, a DNS-el szemben futó EtBr-al tettük láthatóvá. A poliakrilamid géleket 15-20 perces 0.5 μg/ml etídium-bromidos festés után 250-300 nm-es UV fénnyel megvilágítva értékeltük ki. A fényképezésre 24 DIN-es Fortepan síkfilmet használtunk.

DNS minták szekvenciaanalízisénél a bázisspecifikus hasítások után a minták elektroforézisére 6-20%-os 300/400/0.4 mm-es poliakriamid-urea denaturáló géleket használtunk. Az alkalmazás feltételei megegyeztek a Maxam és Gilbert által leirottakkal (113).

A radioaktív izotóppal jelzett minták detektálására a poliakrilamid

géleket nedves állapotban, az agarózgéleket beszárítva, szobahőn screen nélkül, -70 ^{o}C-on a radioaktív jelek intenzitását megnövelő Doupont screen-t alkalmazva különböző hosszúságú ideig autoradiografáltuk. A használt RTG film minden esetben Medifort márkájú volt.

A molekulatömeg meghatározást több restrikciós enzimre ismert fizikai térképpel rendelkező, az adott molekulatömeg tartományban számos fragmentumot adó DNS minták elektroforézisével történt. A fragmentumok molekulatömegének logaritmusát az elmozdulás függvényében ábrázolva kalibrációs egyenes készíthető, melyről az ismeretlen fragmentum molekulatömege egyszerűen visszakereshető. Ismert molekulatömegű markereket különböző restrikciós enzimek felhasználásával a pBR322 plazmidból (12,179), és származékaiból, valamint a lambda fágból (34) állítottunk elő.

IV.2.4. Molekulatömeg alapján elválasztott DNS fragmentumok visszanyerése agaróz és poliakrilamid gélekből

Elektroforézissel elválasztott DNS fragmentumokat fizikai térképezés, szekvenciaanalízis vagy ligálási reakciókban (klónozás) használtunk fel. Az elválasztott minták izolálására Tabak és Flavell (180), vagy Winberg és Hammarskjöld (186) által leírt módszerekkel vagy elektroelúcióval történt. A kinyert fragmentumokat általában fenol-kloroformos extrakcióval és az azt követő 96%-os etanolos kicsapással tisztítottuk.

IV.2.5. DNS fragmentumok összekapcsolása T4 polinukleotid ligázzal

A restrikciós emésztés után elektroforetikusan elválasztott és izolált DNS fragmentumokat - tompa és ragadós végek esetében egyaránt - a T4 bakteriofág által fertőzött E. coliból preparált fágeredetű polinukleotid ligázzal kapcsoltuk össze. A reakciókörülmények megegyeztek a New England Biolabs Katalógus (120) által javasoltakkal. Az inszertálandó DNS fragmentum általában 3-5 x-ös fölöslegben volt a vektormolekulához képest (10-30 µg/ml) a ligálási reakcióban.

Szintetikus linkerek ligálása esetén a Maniatis és mtsai (110) által leírt reakciókörülményeket alkalmaztuk.

IV.2.6. Átfedő delécióssorozatok kialakítása Bal31 nukleázzal

Lineáris DNS mintáink átfedő delécióssorozatainak kialakítását Bal31 nukleázzal 12 mM $CaCl_2$, 12 mM $MgCl_2$, 0.2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA összetételű 50 ul végtérfogatú reakcióelegyben, a kívánt rövidítés mértékétől függően 30 vagy 37 ^{o}C-on kb. 100 µg/ml DNS koncentrációt alkalmazva végeztük el. A rövidítés mértékét az enzimkoncentráció változtatásával is szabályoztuk. Az összeállított reakcióelegyeket még az enzim hozzáadása előtt 30 vagy 37 ^{o}C-on 5 percig inkubáltuk, majd a reakció elindítása után 1, 2, 4, 8, 16 és 32 perccel 8 µl-es frakciókat szedtünk és ezekben a reakciót leállítottuk. A leállítás kétféle módon történt:

-8 µl 20 mM EDTA, 1% SDS hozzáadásával 0 ^{o}C-on

-42 µl H_2O hozzáadása után folyékony nitrogénben

A minták fenolos extrakciója és etanolos kicsapása után ellenőriztük a rövidülés mértékét, majd a megfelelő frakciókat ligálási reakciókban

használtuk fel (110).

IV.2.7. E. coli transzformációja plazmid DNS-el

Az E. coli baktériumok transzformációjára két eljárást alkalmaztunk:

-a klasszikus $CaCl_2$-os (31) módszert (általában kész plazmidkonstrukciók retranszformálására)

-a Hanahan által leírt (69) eljárást (főleg rekombináns klónok izolálása során)

A Cohen és mtsai (31) által leírt $CaCl_2$-os módszer előnye főleg gyorsaságában és egyszerűségében rejlik, viszont az így elérhető maximális transzformációs gyakoriság eléggé alacsony, nem haladja meg a 10^6telep/μg plazmid DNS értéket. A transzformáció során az alábbi lépéseket hajtottuk végre:

- A_{550} = 0.4-0.6 értékig növesztettük a baktériumkultúrákat.
- A táptalaj lehűtése után (0 ^{o} C-on) a sejteket JA 20-as centrifugában 4000 rpm-es fordulaton +4 ^{o}C-on kiülepítettük.
- A baktériumokat 25 ml 0.1 M-os $MgCl_2$-ben szuszpendáltuk, majd a fenti értékek mellett újra centrifugáltuk.
- A felülúszót leöntve a sejteket 2.5 ml 0.1 M-os $CaCl_2$-ben vettük fel, majd 1 órán át 0 ^{o}C-on inkubáltuk. Ezután a kompetens sejteket 200 μl-es aliquotokba osztottuk szét és általában 20-50 ng cirkuláris plazmid DNS-t adtunk hozzájuk.
- További egy órás 0 ^{o}C-os inkubálás után a baktériumsejteket 42 ^{o}C-on 2 percig hősokkoltuk, majd 0 ^{o}C-on 1 ml YTB táptalajt mértünk rájuk és 37 ^{o}C-on 30 percig tartottuk a tenyészeteket. A transzformált baktériumszuszpenzióból 100-200 μl-t szélesztettünk a

megfelelő antibiotikumot tartalmazó YTA lemezre. Az antibiotikum elleni rezisztenciagént a bejutatott plazmidkonstrukciókról fejeződött ki a transzformált baktériumsejtekben.

A Hanahan által leírt transzformációs eljárás előnye az igen magas transzformációs gyakoriság. (10^8-10^9 telep/µg plazmid DNS) Hátrányai közé sorolható bonyolultsága, speciális vegyszerigénye, és az a megszorítás, hogy csak bizonyos E.coli törzsek esetében (pl. JM107,DH5) érhető el ez az érték.

A módszert alkalmazva a következő lépéseket hajtottuk végre:

- Frissen növesztett, kb. 2 mm átmérőjű teleppel oltottuk be a 300 ml-es lombikban levő 30 ml SOB táptalajt és 37 ^{o}C-on intenzív rázatás közben A_{550} = 0.8-1.0-es értékig szaporítottuk.
- A kultúra hűtése után detergensmentes üvegcsövekben centrifugáltuk a sejteket. (JA 20-as centrifuga, 10 perc, 4000 prm, 4 ^{o}C)
- A baktériumokat 10 ml TFB-ben szuszpendáltuk, majd 30 perc állás után a fenti módon újra centrifugáltuk.
- A felülúszó leöntése után a baktériumokat 2.5 ml TFB-ben újra szuszpendáltuk és 84 µl DMSO-t, majd 5 perc eltelte után 84 µl 2.25 M DTT-t, újabb 5 perc eltelte után 84 µl DMSO-t adtunk hozzá.
- A kompetens sejteket 200 µl-enként szétosztottuk és hozzájuk mértük a 20-50 ng mennyiségű plazmid DNS-t. 30 perces 0 ^{o}C-on történő inkubáció után 42 ^{o}C-on 90 másodpercig hősokkoltuk a baktériumokat.
- 0 ^{o}C-ra hűtöttük vissza a hősokkolt transzformált sejteket, majd 1 ml SOC táptalaj hozzáadása után 37 ^{o}C-on 1 órán keresztül inkubáltuk a kultúrákat. Inkubálás után 100-200 µl transzformált baktériumot szélesztettünk ki a megfelelő antibiotikumot tartalmazó

YTA lemez felületére.

Laboratóriumunkban így rutinszerűen 10^7-10^8 telep/ug plazmid DNS transzformációs gyakoriságot sikerült elérnünk.

A TFB összetétele: 10 mM MES-KOH pH 6.3, melyet sterilre szűrt oldatokkal 100 mM $RbCl_2$, 45 mM $MnCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, és 3 mM $(NH_4)_6CoCl_3$ végkoncentrációra egészítetünk ki.

IV.2.8. DNS minták radioaktív végjelölése

A restrikciós hasítás által keletkezett 5'-P végeket bakteriális alkalikus foszfatázzal (BAP), vagy borjúbél foszfatázzal (CIP) defoszforiláltuk, majd T4 polinukleotid kináz és magas aktivitású (γ-^{32}P)ATP-vel foszforiláltuk a Maniatis és mtsai (110) által leírt módszer alkalmazásával.

Rejtett 3' végek jelölésére Klenow-polimerázt (88) és (α-^{32}P)ATP-t használtunk. A reakciót a következő komponensekből mértük össze:

DNS	max. 1 µg
10 x Klenow puffer	3 µl
2 mM dNTP keverék - dATP	3 µl
20 µCi (α-^{32}P)dATP	2 µl-ben
Klenow-polimeráz	1 µl
UP-víz	30 µl-ig

---

20 perc inkubálás szobahőn

+3 µl 2 mM dATP

---

10 perc inkubálás szobahőn

Fenol-kloroformos extrakciót követően a jelölt DNS fragmentumot Sephadex G-75 oszlopon végzett gélszűréssel választottuk el a be nem épült radioaktív nukleotidoktól.

A restrikciós hasítóhelyeket tartalmazó szintetikus linkerek foszforilálása a Maniatis és mtsai által közölt eljárással (110) történt.

IV.2.9. DNS szekvencia meghatározása Maxam-Gilbert módszerével

A Bal31 nukleázzal képzett átfedő delécióssorozatok végpontjainak meghatározására a kísérletek során a Maxam és Gilbert által 1980-ban kidolgozott kémiai szekvenciaanalízis módszerét alkalmaztuk (113). A szekvenálandó DNS darabokat restrikciós endonukleázokkal történő hasítás és izolálás után 5' végeiken T4 polinukleotid kinázzal, 3' végjelölés esetében pedig Klenow-polimeráz felhasználásával a fent leírt módszerek valamelyikével végjelöltük. Megfelelően választott restrikciós enzim alkalmazásával a két végén jelölt fragmentumot két aszimmetrikus darabra vágtuk, majd a szekvenálandó (mostmár csak egyik végén jelölt) DNS szakaszt gélből visszanyertük.

Az eredeti hivatkozásban közölt többféle bázisspecifikus módosítások közül mi az alábbi négyet használtuk:

<u>Guanin</u>: 4.5 µl egyik végén jelölt DNS
(max.1 µg)
0.5 µl carrier DNS (0.5 µg)
200 µl DMS puffer (50 mM
Na-kakodilát, 1mM EDTA)
1 µl DMS

5 perc 20 °C, majd 50 µl DMS stop puffer 0 °C (1.5 M Na-acetát pH 7.0, 1 M merkaptoetanol, 100 µg/ml tRNS

Guanin+Adenin: 9 µl jelölt DNS + 1 µl carrier DNS
25 µl 88%-os hangyasav
10 perc inkubálás 20 °C-on
200 µl hidrazin stop (0.3 M Na-acetát, 0.1 mM EDTA, 25 µg/ml tRNS, 0 °C

Citozin: 4.5 µl jelölt DNS + 0.5 µl carrier DNS
15 µl 5 M NaCl
30 µl hidrazin
10 perc 20 °C-on, majd 200 µl hidrazin stop, 0 °C

Citozin+Timin: 9 µl jelölt DNS + 1 µl carrier DNS
10 µl UP-víz
30 µl hidrazin
10 perc 20 °C-on, majd 200 µl hidrazin stop, 0 °C

A reagensek maradékát kétszeres alkoholos kicsapással és egy alkoholos mosással távolítottuk el. A beszárított DNS-t 100 µl 1 M-os piperidin oldatban vettük fel és 90 °C-on 30 percig inkubáltuk, mialatt megtörtént a DNS lánchasítás az egyes specifikusan módosított bázisoknál. A piperidint háromszori beszárítás útján távolítottuk el a reakciócsövekből, először a 100 µl-es reakcióelegy, majd kétszer 40 µl UP-víz elpárologtatásával. A második 40 µl víz rámérése után a

mintákat új Eppendorf csövekbe vittük át, mivel 90 ^{o}C-on a piperidin a reakcióedény falával is reakcióba léphet és eltávolítása rendkívül nehézkes.

A mintákat - a radioaktivitás értékektől függően - 3 µl/reakció (vagy ennek többszörösei) felvivő pufferben oldottuk vissza. A puffer összetétele 80 v/v% kétszer ioncserélt formamid, 50 mM Tris-borát pH 8.3, 10 mM EDTA, 0.1 w/v% xiléncianol, és 0.1 w/v% brómfenolkék volt.

A G és C specifikus reakciókból maximum 5 x 10^4 cpm, a G + A és C + T reakciókból maximum 10^5 cpm radioaktív fragmentet vittünk fel a szekvenciázó gél egy-egy zsebébe.

IV.2.10. A galaktokináz enzimaktivitás mérése

A terminátor/riportergén konstrukciókat tartalmazó E. coli C600<u>galK</u>$^-$ sejteket 100 µg/ml ampicillin és 1 mM IPTG-t tartalmazó YTB táptalajban erőteljes rázatással A_{650} = 0.6-es értékig növesztettük. 1 ml mintát Eppendorf csőbe vittünk át és 40 µl lízis puffert valamint 4-5 csepp toluolt adtunk a reakciókhoz. Erőteljes keverés (20-30 mp vortex) után a csöveket nyitott kupakkal 30 percre 37 ^{o}C-os vízfürdőre helyeztük, hogy a toluol elpárolgását megkönnyítsük. A 30 perc eltelte után a feltárt baktériumokból - két párhuzamos sorozat alkalmazásával - galaktokináz aktivitásokat mértünk a következő módon:

20 µl feltárt baktérium + 80 ul reakcióelegy, mely a következő komponenseket tartalmazta:

20 µl 1-es oldat

50 µl 2-es oldat

10 µl ^{14}C-U- galaktóz (4-es oldat)

A mintákat 15 percig 32 ^{o}C-os vízfürdőn inkubáltuk, majd 50 µl-üket 2.5 cm átmérőjű DE81-es filterre vittük. Az összegyűjtött filtereket 3 x 2 l desztillált vízzel folyamatos rázatással mostuk. A galaktokináz értékeket nanomol foszforilált galaktóz/perc/A_{650} mértékegységben fejeztük ki.

A mérés befejezése után két véletlenszerűen választott reakciócsőből 25-25 µl mintát csöppentettünk DE81-es filterekre. Ezeket a filtereket nem mostuk desztillált vízzel. A filtereket Whatman szűrőpapírra helyezve infravörös lámpa alatt megszárítottuk, majd szcintillációs küvettákba helyezve 5-5 ml toluolos koktélt mértünk rájuk. A ^{14}C aktivitásokat Beckman szcintillációs számlálóban háromszori ismétléssel mértük.

A mérés során felhasznált oldatok összetétele a következő volt:

1-es oldat	2-es oldat	3-as oldat
5 mM DTT	8 mM $MgCl_2$	100 mM EDTA
16 mM NaF	200 mM TRIS-HCl pH 7.9	100 mM DTT
	3.2 mM ATP	50 mM TRIS-HCl pH 8.0

4-es oldat: a ^{14}C-U-galaktóz specifikus aktivitása 40-60 mCi/mM volt. Az izotópból 4.5 x 10^6 dpm/µmol hígítást készítettünk és ezt az oldatot használtuk a mérések során.

Megjegyezzük, hogy az átalakított ^{14}C-U-galaktóz aktivitástól függően a feltárt sejtek mennyisége csökkenthető vagy növelhető a mérések során. (A mérés körülbelül 25% galaktóz/galaktóz-foszfát átalakításig lineáris.) A galaktokináz aktivitások számítására a következő formulát használtuk:

$$\text{galaktokináz egységek} = \frac{(\text{mért beütés} - \text{vak}) \times 5200}{\text{mosatlan filterek átlagos beütése} \times \text{inkubációs idő} \times A_{650}}$$

V. A KÍSÉRLETEK LEÍRÁSA

V.1. Terminátorszelekciós plazmidvektorok kialakítása

A transzkripciós cisz-regulátorok széleskörű in vivo tanulmányozásának lehetőségét a több mint két évtizeddel ezelőtt kidolgozott génfúziós technikák bevezetése teremtette meg (114 és hivatkozásai). A módszer lényege, hogy a vizsgálni kívánt transzkripciós szabályozóelemet (pl. promótert, operátort) genetikai fúzióval egy könnyen mérhető és emellett szelektálható ún. riportergén (rendszerint kvantitatíve egyszerűen mérhető enzimek génjei pl. β-galaktozidáz, galaktokináz, luciferáz stb.) kapcsolják. Ezekben a konstrukciókban a tanulmányozni kívánt transzkripciós regulátoroktól függ az ismert géntermék baktériumsejten belüli kifejeződése. A génfúziós technikák második generációjaként jelentek meg azok az in vitro DNS rekombinációs technikákkal kialakított plazmid, vagy fágvektorok, melyek az eredetileg alkalmazott in vivo génfúziós megközelítés számos hátrányát (pl. többszörös fúzió különböző szabályozóelemekhez, transzkripciós vagy transzlációs polaritás kialakítása a riportergénen belül) kiküszöbölték (23,24,38,73,77,109,129,150).

V.1.1 A pKL300ΔH terminátorszelekciós plazmid konstrukciója

A jelenleg használt nagyszámú fúziós vektor közül az rrnB operon komplex transzkripciós terminátorrégiójának tanulmányozására a McKenney és mtsai (114, és személyes közlés) által kifejlesztett pKL300 plazmidot választottuk. A vektor konstrukciója során az

eredetileg promóter nélküli pKO-1 plazmid feltöltött EcoRI helyére SalI linkert ültettek, majd egy következő lépésben az új konstrukció (pKO-8) egyedi SmaI helyére inszertálták az M13mp9 bakteriofág 300 bp-os PvuII-PvuII polilinker darabját.

Az így kialakított pKL300 terminátorszelekciós vektor egy pBR322 alapú, ColE1 replikációs origójú, ampicillin rezisztenciamarkert hordozó plazmid. Az M13mp9 eredetű DNS fragmenten átvitt vad típusú lac promóter-operátor szakasz biztosítja a transzkripciós szignálok in vivo analízisében alkalmazott riportergén - esetünkben a galaktokináz - kísérletező által kontrollálható átírását. A promóter és a riportergén között számos egyedi restrikciós hasítóhely van, ezek felhasználásával építhető be a vizsgálandó terminátor a promóter és a riportergén közé. A terminátorfragment beépítése után tapasztalható galaktokináz enzimaktivités esés a bevitt szignál erősségével arányos. A terminátorok inszerciója megfelelő táptalajon (galaktózos McConkey agaron) egyszerű színszelekcióval is követhető. (A terminátort hordozó klónok fehér, míg a terminátor nélküliek piros szinűek.)

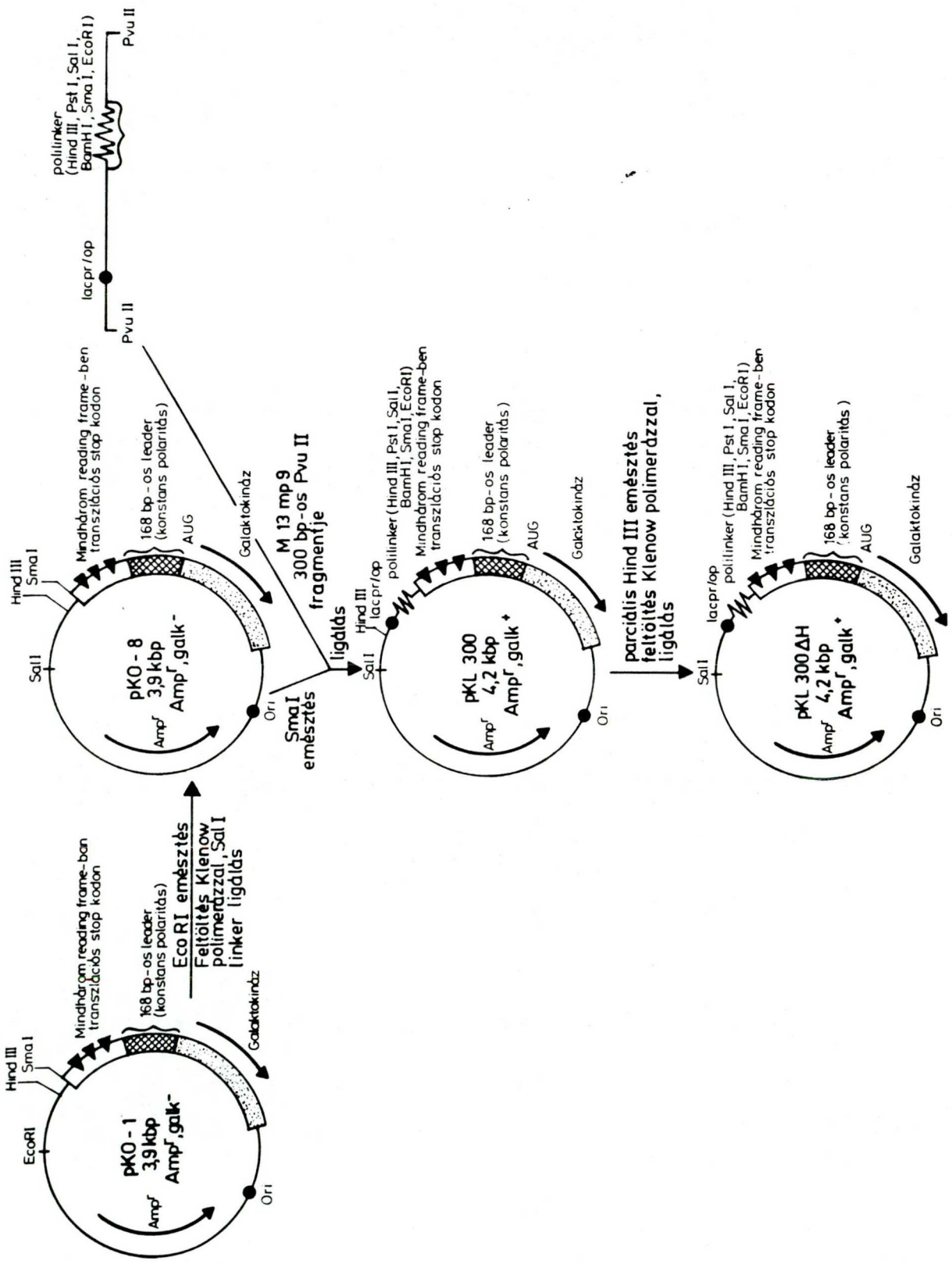
Mivel a későbbiek során terminátorkonstrukcióinkat a plazmid lac promótere és galaktokináz gén közötti HindIII helyére építve akartuk tesztelni, a promóter előtti másik HindIII restrikciós hasítóhelyet el kellett távolítanunk a pKL300-ból.

Ehhez a plazmidot HindIII enzimmel részlegesen megemésztettük, majd a keletkező 5' túlnyúló végeket Klenow-polimerázzal feltöltöttük. A reakció után a plazmidokat T4 DNS ligáz segítségével recirkularizáltuk és kompetens C600galK$^-$ baktériumsejteket transzformáltunk a ligátummal. A rekombinánsok közül azokat a plazmidokat válogattuk ki, melyekben a promóter mögötti HindIII hely ép maradt. Egy esetben a

rekombináns plazmid szerkezetét a feltöltött HindIII hely környezetében Maxam-Gilbert szekvenciaanalízissel ellenőriztük. A későbbiek során ezt a konstrukciót - pKL300 ΔH - használtuk terminátoraink in vivo tesztelésére. A plazmid kialakításának lépéseit a 9. ábra szemlélteti.

V.1.2. A pKL02 terminátorszelekciós vektor konstrukciója

A pKL300 ΔH plazmidban a tesztelt terminátorokat működőképes riboszómakötő hely (Shine-Dalgarno szekvencia) és transzlációs iniciációs szignál előzi meg. Emiatt - különösen rövid terminátorfragmentumok esetében, melyek transzlációs stop kodonok híján gyakran teljesen transzlálódnak - a transzkripció termináció folyamatait a transzlációs hatások jelentősen torzíthatják (70,149). A zavaró transzlációs effektusok kiküszöbölését a Shine-Dalgarno szekvencia, és az AUG transzlációs iniciációs kodon eltávolításával oldottuk meg. A pKL300 ΔH plazmidot a lac promóter mögötti egyedi HindIII helyen felnyitottuk, rövid ideig Bal31 nukleázzal kezeltük, majd T4 DNS ligáz segítségével visszazártuk. A továbbiakban a rekombinánsok közül egy olyan deléciós származékot szelektáltunk, melyben (a Maxam-Gilbert szekvenciaanalízis eredménye szerint) a Shine-Dalgarno szekvenciát közvetlenül megelőző C nukleotid a polilinker SalI helyéhez fúzionált. Mivel a Bal31-es deléció a plazmid egyedi HindIII helyét is eltávolította, ennek pótlásáról gondoskodnunk kellett. A deléciós származék polilinkerének épen maradt rövid BamHI-EcoRI szakaszát (kb. 10 bp) a pHC314 plazmid (17) 100 bp-os több restrikciós hasítóhelyet (közöttük a HindIII-ét is) tartalmazó BamHI-EcoRI fragmentumára cseréltük ki. Az így kialakított plazmid



9. ábra. A pKL300ΔH plazmid konstrukciója. Magyarázat a szövegben.

(pKL01) EcoRI helyét EcoRI emésztést követő Klenow-polimerázos feltöltéssel eliminálva alakítottuk ki a pKL02 konstrukciót. Ebben a fúziós vektorban bármely terminátorszignál működése a zavaró transzlációs effektusok nélkül tanulmányozható. A pKL300 H és a pKL02 plazmidok promóter régióinak összehasonlítása látható a 10. ábrán.

pKL300ΔH:

CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGA

AAACAGCTATGACCATTGATTACGCCaagcttggctgcaggtcgacggatccccgggaattc

pKL02:

CCCCAGGCTTTACACTTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACgtcg

acggatccgggcaacgttgttgccattgctgcaggcggagaactggtaggtatggaagatctctagaagcttatcg

atgataagctgtcaaacatgagaattc

10. ábra. A pKL300 ΔH és a pKL02 vektor promóterrégióinak összehasonlítása. A promóterek -35-ös régióját téglalap, a -10-es régiót alá és föléhúzás jelzi, a transzlációs iniciációs szignált aláhúzással jelöltük. Kör mutatja a transzkripciós iniciációs pontot, hullámos vonal a riboszómakötő helyet, szaggatott vonal a lac operátort. A polilinker szekvenciáját kisbetűkkel szedtük.

V.1.3. A pKL300-17 plazmid kialakítása

A galaktokináz háttéraktivitás meghatározására a pKL300 vektor 197

bp-os lac promóter/operátor szekvenciát kódoló fragmentumot a plazmidból HindIII emésztéssel kiejtettünk. Az emésztést követően a plazmidot T4 DNS ligázzal recirkularizáltuk és kompetens C600galK$^-$ baktériumsejtekbe transzformáltuk. Galaktózos McConkey lemezről fehér (promóter nélküli) baktériumtelepeket izoláltunk és belőlük plazmidot preparáltunk. A plazmidok több enzimmel elvégzett restrikciós analízisével, valamint Maxam-Gilbert szekvenciaanalízissel igazoltuk a konstrukciók helyességét.

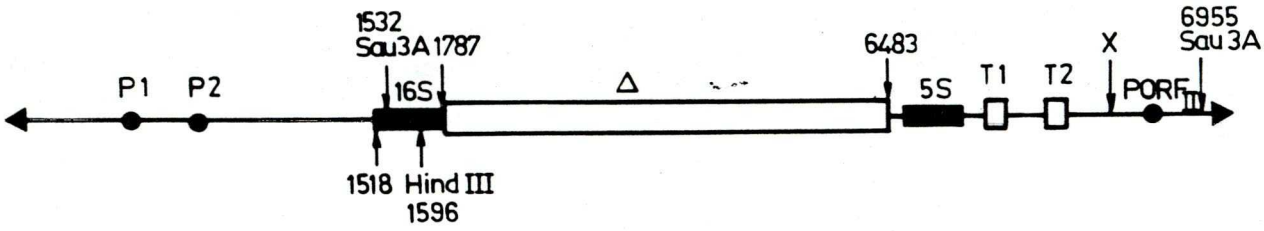
A promóter nélküli galaktokináz gént tartalmazó plazmidra a továbbiakban pKL300-17 néven hivatkozunk.

V.2.1. Az rrnB operon terminátorainak elkülönítése más transzkripciós szignáloktól

A munka során alkalmazott kísérletes megközelítés lényege az volt, hogy az rrnB operon komplex terminátorrégióját, annak önálló elemeit, és az elemek különböző kombinációját egy terminátorszelekciós vektor lac promótere és a galaktokináz riportergén közé építettük, majd az in vivo terminációs hatékonyságot a galaktokináz enzim aktivitásának mérésével határoztuk meg. Mivel az irodalomban számos példa bizonyítja, hogy a terminátorok efficienciáját - a régebbi elképzelésekkel ellentétben - nagymértékben befolyásolják a transzkripciót indító promóterek tulajdonságai, a kísérletek során mindvégig egyetlen promótert használtunk (59,181).

A kísérleti objektumként választott rrnB terminátorok - csoportunk korábbi munkájának eredményeképpen - klónozott formában rendelkezésre álltak a p20418-23 jelű plazmidvektorban (13,15). A plazmid a terminátorokon kívül tartalmazza még az rrnB operon teljes

promóterrégióját a transzkripciós startpont előtti mintegy 1800 bp-os DNS szakaszon, a deléciós 16S DNS kb. 270 bp-os darabját, a teljes 5S DNS-t, és az ampicillin rezisztencia génjét. A komplex terminátorrégiót hordozó szakasz 410 bp-al az érett 5S RNS gén mögött végződik. A plazmid rrnB eredetű részleteit mutatja a 11. ábra:



11. ábra. A p20418-23 plazmid rrnB operon eredetű részlete. A P1 és P2 az operon két promóterét, a T1 és T2 az operon terminátorait jelöli. A riboszómális RNS eredetű szakaszokat sötét téglalapok mutatják, míg a delta jel in vitro kialakított deléciót szimbolizál. A terminátorok mögött egy fehérjekódolásra alkalmas gén promótere (P_{ORFII}) lokalizálható. Az ábra fölötti és alatti nyilak az egyes restrikciós enzimek hasítóhelyeit jelölik a Brosius szerinti (25) számozás alapján. Egyéb magyarázat a szövegben.

Brosius és mtsai. (25) kimutatták, hogy az rrnB gént lezáró komplex terminátorrégiót követően egy fehérje kódolására alkalmas DNS szakasz (ORF II) lokalizálható, mely saját riboszómakötő hellyel rendelkezik. A fehérje promóterének -35-ös régiója az rrnB T2 terminátortól 30 bp-ra található. Az ORF II transzlációs terminációs kodonja átfed a mögötte lévő birA gén (80) transzlációs iniciációs kodonjával. Mivel a birA gén előtt az intenzív kutatások ellenére sem találtak semmiféle promóterszerű szerkezetet, igen valószínű, hogy az ORF II és a birA gén transzkriptuma ugyanarról a funkcionális ORF II promóterről

induló policisztronos messenger RNS. Az általunk alkalmazott kísérleti elrendezésben az in vivo terminációs hatékonyságok meghatározását a különböző terminátorkonstrukciókkal együtt beépített promóterek lehetetlenné tették volna, ezért gondoskodnunk kellett azok eltávolításáról.

Első lépésben a p20418-23 plazmidból egy 727 bp-os Sau3A fragmentumot izoláltunk. Ez a DNS csupán a 16S eredetű szekvenciákat, az 5S RNS génjét, az rrnB komplex terminátorrégióját, valamint az ORF II fehérje promóterét tartalmazta. Ezzel a lépéssel sikerült eltávolítanunk az rrnB gén saját promótereit.

Az ORF II promótert egy másik restrikciós endonukleáz, az X-enzim segítségével szeparáltuk a terminátoroktól. Ez az enzim öt nukleotid hosszuságú aszimmetrikus DNS szakaszt ismer fel és a felismerési szekvencia mögött két bázispárral hasítja a DNS láncot az alábbi módon:

5'-CTCTTCNN/NN-3'

3'-GAGAAGNN/NN-5'

Esetünkben a 727 bp-os Sau3A fragmentumon csupán egyetlenegy X-enzim hasítóhely lokalizálható a T2 terminátor mögött 14 bp-ra, a T2 és az ORF II promóter -35-ös régiója között. Az X-enzimhasítást követően a fragmentum végeihez CCGGATCCGG szekvenciájú BamHI, majd CCAAGCTTGG szekvenciájú HindIII linkert kapcsoltunk, és a HindIII hasítás után keletkezett 573 bp-os fragmentumot a pKL300 ΔH terminátorszelekciós vektor egyedi HindIII helyére építettük.

Az így kialakított plazmidok közül a pKLT1 normál, a pKLT6 reverz orientációban tartalmazza a promóterektől elválasztott

terminátorrégiót. A konstrukciók helyességét restrikciós térképezéssel, majd Maxam-Gilbert szekvenciaanalízissel ellenőriztük. A nukleotidsorrend meghatározása felfedte, hogy a terminátorok mögötti szakaszon az X-enzimhasítást követően a preparátum kismértékű exonukleáz szennyeződése folytán a fragmentum néhány nukleotiddal megrövidült. Mivel ez a rövidülés a komplex terminátorrégió egyetlen elemét sem érintette, a további kísérletekben (in vitro delécios mutagenezis, elemenkénti szubklónozás) a fenti konstrukciókat használtuk fel.

A többlépéses in vitro manipulációval kialakított komplex terminátorrégió nukleotidsorrendjét a 12. ábra szemlélteti.

12. ábra. A többlépéses in vitro manipulációval kialakított terminátorfragmentum nukleotidsorrendje. A számozás a Brosius és mtsai (25) által leírtakkal egyezik meg. A szubklónozási kísérletekben használt restrikciós hasítóhelyeket, a T1 és T2 terminátorok inverted repeat-jeit, valamint a terminátorok közötti két kisebb inverted repeatet (IR1 és IR2) aláhúzás jelöli.

V.3.1. Átfedő deléciósorozatok kialakítása T1 terminátorban és annak környékén célzott in vitro deléciós mutagenezissel

A Brosius és mtsai. által közölt (25) szekvenciaadatok alapján úgy tűnt, hogy az rrnB gén transzkripciós terminációs folyamataiban a T1 terminátor játssza a főszerepet. Ezt az elképzelést a következő adatok támasztották alá:

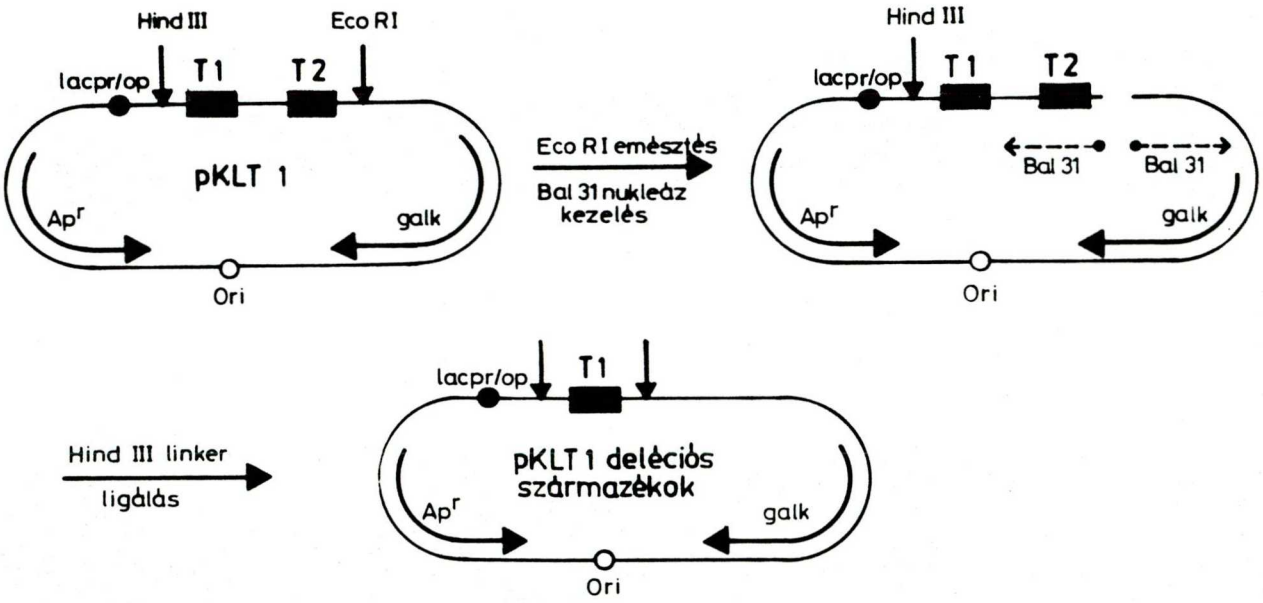
- A T1 terminátort meghatározó tükörszimmetrikus DNS igen hosszú, (mintegy 44 bp) hajtűszerű másodlagos szerkezet kialakítására képes RNS-t kódol. Az RNS másodlagos szerkezetének termodinamikai stabilitása (a hajtűn belüli kiterjedt és pontos bázispárosodás révén) igen magas.
- Az I-es típusú terminátorokra jellemző U-sorozat az átlagosnál hosszabb, 11 nukleotidnyi szakaszon lokalizálható.
- A T1 terminátor nagyfokú hasonlóságot mutatott a munka kezdeti szakaszában már ismert nukleotidsorrendű rrnD operon terminátorával (45,103).

A fenti adatok figyelembevételével először az rrnB T1 terminátor struktúra-funkciós összefüggéseinek részletes vizsgálatát állítottuk kutatásaink középpontjába. A következő kérdésekre kerestük a választ:

- Képes-e a T1 terminátor a komplex régió más elemei nélkül komplett terminációt előidézni?
- Mi az a minimális szekvencia, amely kijelöli a T1 terminátor funkcionális határait?
- Hogyan befolyásolják az I-es típusú terminátorokra jellemző struktúrák (hajtű + U-sorozat) mögötti DNS szakaszok a T1 által kiváltott transzkripciós terminációs folyamatot?

A felmerült kérdések megválaszolására a komplex transzkripciós

terminátorrégiót hordozó plazmidból (pKLT1) in vitro célzott deléciós mutagenezissel 3' végi deléciósorozatokat alakítottunk ki a T1 terminátorban és annak környezetében. A deléciós mutagenezist Bal31 nukleáz felhasználásával hajtottuk végre. Ennek főbb fázisait a 13. ábra szemlélteti:



13. ábra. A T1 terminátor származékainak kialakítása célzott, in vitro deléciós mutagenezissel. Magyarázat a szövegben.

A mutagenezis első lépésében a pKLT1 plazmidot a polilinker terminátorok mögötti egyedi EcoRI helyének felhasználásával linearizáltuk. A linearizált plazmidot ezután különböző hőmérsékleten (30 ill. 37 ^{o}C) Bal31 nukleáz kezelésnek vetettük alá. A reakciókból időközönként mintát vettünk és ezekben az aliquotokban a Bal31 működését a csövek folyékony nitrogénbe helyezésével, vagy fenol-kloroformos extrakcióval állítottuk le.

Etanolos kicsapás után a - Bal31 működési mechanizmusából adódóan - mindkét irányban megrövidült plazmidmolekulát HindIII linker (CCAAGCTTGG) közbeiktatásával recirkularizáltuk, majd a ligátumokkal kompetens C600galK$^-$ baktériumsejteket transzformáltunk. Az egyedi baktériumtelepekből preparált plazmidok közül azokat a konstrukciókat teszteltük tovább, melyekben megrövidült, de HindIII enzimmel kivágható terminátorfragmentumokat találtunk. (Az így kialakított plazmidmolekulákban a fragmentumok rövidülése a Bal31 nukleáz működését, míg a HindIII emészthetőség a HindIII linker beépülését indikálta.)

A rekombinánsokat a terminátorfragmentumok hossza alapján úgy válogattuk, hogy a T1 terminátor elemeinek, és a T1 mögötti régiónak egy részletes, jó felbontású deléciós mutánsparkját állítsuk elő. A fenti meggondolások alapján szelektált plazmidokat a továbbiakban kis specifitású restrikciós enzimekkel térképeztük, hogy a Bal31-es deléciók végpontját minél nagyobb pontossággal behatároljuk.

A restrikciós térképezések adatainak figyelembevételével a komplex terminátorrégió származékaiból néhány reprezentatív mutánst választottunk ki, melyek végpontját Maxam-Gilbert szekvenciaanalízis felhasználásával nukleotidpontossággal lokalizáltuk. Mivel a kísérletek későbbi fázisában a mutánsok in vivo terminácós hatékonyságának meghatározását tekintettük fő feladatunknak, ezeket a származékokat a pKL300ΔH vektor egyedi HindIII helyére építettük át. Az átklónozási kísérletekre azért volt szükség, mert a pKLT1 plazmid Bal31 nukleázos mutagenezise során nemcsak a terminátorfragment, de a lineáris molekula másik végén elhelyezkedő galaktokináz riportergént kódoló szekvenciák, vagy a galaktokináz gén előtti szakaszok is részben vagy egészben eliminálódhattak. A riportergén sérülése

lehetetlenné teszi az in vivo mérések kivitelezését, míg a polilinker és a galaktokináz közötti szekvenciák különböző mértékű csonkítása eltérő mRNS másodlagos szerkezetek kialakulását idézi elő közvetlenül a riportergén transzlációs szignáljait kódoló szakaszon. Ezek mellett a deléciók révén a leader szakasz transzlációs polaritási viszonyai is jelentősen megváltozhatnak. A két utóbb említett effektus a konstrukciók tágabban értelmezett riportergén szakaszának lényeges módosításával megakadályozza a kvantitatív mérési adatok reális kiértékelését. Mindezek a nemkívánatos hatások egyszerűen kiküszöbölhetők a fragmentumok intakt pKL300 ΔH vektorba való átépítésével. Az átklónozási kísérletekkel előállított plazmidkonstrukciók főbb jellegzetességeit a 3. táblázat mutatja.

Plazmid	Kezdőpont	Végpont	Fragmenthossz	Orientáció
pKLT4	1598	6686	392 bp	normál
pKLT2	1598	6686	392 bp	fordított
pKLT3	1598	6775	481 bp	normál
pKLT9	1598	6588	294 bp	normál
pKLT10	1598	6588	294 bp	fordított
pKLT12	1598	6741	447 bp	normál
pKLT19	1598	6653	359 bp	normál
pKLT21	1598	6653	359 bp	fordított
pKLT23	1598	6712	418 bp	normál
pKLT24	1598	6712	418 bp	fordított

3. táblázat. A táblázat a pKLT1 plazmid terminátorfragmentjének 3' végi Bal31-es deléciós mutagenezisével kialakított T1 származékok legfontosabb sajátságait szemlélteti. A fragmentumok kezdő és végpontja a Brosius szerinti számozást követi. Egyáb magyarázat a szövegben.

V.3.2. A T1 terminátor deléciós származékainak kvantitatív in vivo analízise

A komplex terminátorrégió T1 elemének funkcionális analízisét az előző fejezetben részletesen tárgyalt Bal31 nukleázzal kialakított konstrukciók in vivo terminációs hatékonyságának meghatározásával végeztük el. A különböző plazmidkonstrukciókkal transzformált C600galK$^-$ baktériumsejtekből az "Anyagok és módszerek" fejezetben leírt módon galaktokináz enzimaktivitásokat mértünk és ezekből terminációs efficienciákat számoltunk. A mérési eredményeket és a terminátormutánsok fontosabb tulajdonságait, valamint terminációs efficiencia értékeit a 4. táblázat, és a 14. ábra mutatja.

Ahogyan azt már a korábbi irodalmi adatok is jelezték (5,24), a teljes komplex terminátorrégiót tartalmazó fragmentum - melyből az összes T1 3' végi mutánst generáltuk - rendkívül erős terminátor (pKLT1, 100%).

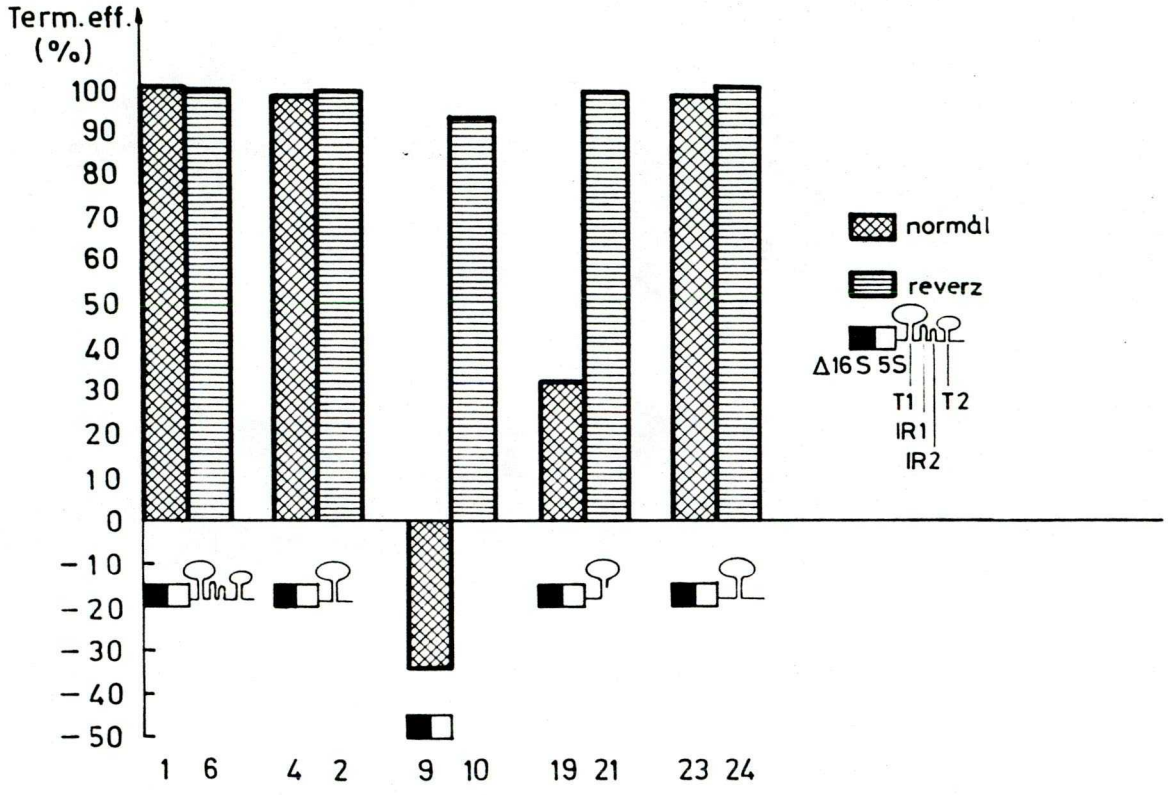
Látható az is, hogy a pKLT4-es mutánsnál (deléciós végpontja a 6686-os pozícióban), valamint a pKLT23-as klónban (deléciós végpont a 6712-es nukleotidnál) a termináció hatékonysága gyakorlatilag ugyanolyan magas, mint az eredeti pKLT1 konstrukció esetében, vagyis a T1 önállóan is tökéletesen hatékony terminátor.. A két deléciós mutáns közötti 26 bp-os különbség a terminációs hatékonyság szintjén nem fejeződik ki.

A fentiekkel ellentétben a pKLT19-es konstrukció, (ahol a deléció a 6653-as nukleotidnál ér véget) jóval alacsonyabb terminációs efficienciát mutatott. Ez azt jelzi, hogy a GC-gazdag hajtűszerkezet utáni T-sorozat nagy részének eltávolítása a terminátorfunkció drasztikus (bár nem teljes) csökkenéséhez vezet. A maradék alacsony,

PLAZMID	TERMINÁTOR ELEMEK ÉS AZOK ORIENTÁCIÓJA	TRANSZLÁLT TERMINÁTOR ELEMEK	galK AKTIVITÁSOK ($nmol/perc/OD_{650}$)	TERMINÁCIÓS HATÉKONYSÁGOK(%)
pKLT1	Δ16S,5S,T1,IR1,IR2,T2(N)	-	0	100
pKLT6	Δ16S,5S,T1,IR1,IR2,T2(R)	T2	0,48	99,79
pKLT4	Δ16S,5S,T1(N)	-	4,35	98,06
pKLT2	Δ16S,5S,T1(R)	T1-ben leáll	1,45	99,36
pKLT19	Δ16S,5S,4/5T1(N)	-	153,42	31,43
pKLT21	Δ16S,5S,4/5T1(R)	a fragmentum. fele	2,67	98,81
pKLT9	Δ16S,5S(N)	-	300,445	-34,30
pKLT10	Δ16S,5S(R)	a fragmentum 1/6-a	14,68	93,44
pKLT23	Δ16S,5S,T1, 1/2IR1(N)	-	4,79	97,86
pKLT24	Δ16S,5S,T1,1/2IR1S(R)	T1 közepén leáll	0,9	99,60
pKLA1	T1,IR1,IR2(R),T2(N)	T1(részben),IR1,IR2	0,036	99,6
pKLA2	T1,IR1,IR2(N),T2(R)	T2	5,49	97,94
pKLA3	T1,IR1,IR2(N)	T1,IR1,IR2	142,96	36,1
pKLA4	T1,IR1,IR2(R)	T1(részben),IR1,IR2	98,13	43,85
pKLA5	T1,IR1(N)	T1,IR1	96,05	30,64
pKLA6	T1,IR1(R)	T1 (részben)	131,61	34,75
pKLA7	T1(N)	T1	186,96	16,43
pKLA8	T1(R)	T1 (részben)	219,66	1,82
pKLA9	IR1,IR2,T2(N)	IR1,IR2	0,34	99,28
pKLA10	IR1,IR2,T2(R)	T2	43,63	83,58
pKLA11	IR2,T2(N)	IR2	5,83	97,4
pKLA12	IR2,T2(R)	T2	112,97	49,51
pKLA13	T2(N)	-	137,01	38,76
pKLA14	T2(R)	T2	87,05	61,09
pKLA15	IR1,IR2(N)	IR1,IR2	169,39	24,29
pKLA16	IR1,IR2(R)	IR1,IR2	199,24	10,94
pKLA17	IR1(N)	IR1	332,19	-48,49
pKLA18	IR1(R)	IR1	246,71	-10,28
pKLA19	IR2(N)	IR2	210,19	6,05
pKLA20	IR2(R)	IR2	269,5	-20,46
pKLA21	Δ16S(N)	-	219,18	2,03
pKLA22	Δ16S(R)	-	38,87	82,63
pKLA23	5S(N)	-	146,08	34,71
pKLA24	5S(R)	végig	330,84	-47,88
pKL300ΔH	-(csak lac promóter)	-	223,71	0
pKL300-17	-(nincs promoter)	-	2,605	0

4. táblázat. A pKLT és pKLA plazmidcsalád tagjainak legfontosabb struktúrális sajátságai, transzlációs viszonyai, galaktokináz enzimaktivitás értékei, és terminációs efficienciái. Egyéb magyarázat a szövegben.

de mérhető terminátoraktivitás valószinűleg a csonka T1 megmaradt GC-gazdag hajtűszerkezetéhez rendelhető. Ezt az elképzelést nagymértékben alátámasztja a pKLT9-es konstrukció analízise. (deléciós végpontja a 6588-as nukleotidnál) A mutáns - melyből a T1 terminátor esszenciális elemei közül mind a hajtű, mind a T-sorozat hiányzik - a kontroll pKL300ΔH plazmidhoz képest inkább növelte, mint csökkentette a galaktokináz aktivitás értékeket. Ez az adat - összhangban az



14. ábra. A pKLT plazmidcsalád terminációs efficienciái. A mutáns plazmidok száma, az egyes terminátorkonstrukciók sajátosságai a nekik megfelelő oszlopdiagramok alatt láthatók. Mindegyik oszlop két vagy több párhuzamos galaktokináz aktivitásmérés eredményét szemlélteti. A mérés menetét az "Anyagok és módszerek" fejezet IV.2.10. pontja tartalmazza. A negatív terminációs hatékonyságok a terminátor nélküli kontrollplazmidnál (pKL300ΔH) magasabb galaktokináz enzimaktivitásokat jelölnek. A normál jelzésű konstrukciókban az rrnB operonnal megegyező, a reverz jelzésű konstrukciókban azzal ellentétes az egyes terminátormutánsok orientációja.

irodalomban eddig közölt hasonló vizsgálatokkal (1,54) - a terminátor hajtű szerepére hívja fel a figyelmet. A pKLT9 konstrukció esetében tapasztalható megemelkedett galaktokináz aktivitás okát egyelőre nem ismerjük.

V.3.3. rrnB T1 - kétirányú terminátor?

Mivel az I-es típusú terminátorok némelyike nemcsak a hajtűszerkezet, de az azt követő T-sorozat szempontjából is csaknem tökéletes szimmetriát mutat, sok kutatóban felmerült a kérdés, vajon képesek-e ezek a terminátorok mindkét orientációban hatékonyan működni (25,53,58,86,130,131,161,192). Bár a probléma felvetése óta körülbelül egy évtized telt el, meglehetősen kevés kísérletes adat gyűlt össze a kérdés adekvát megválaszolására. Csupán egyetlen esetben sikerült egyértelműen igazolni (140) mind in vitro, mind in vivo kísérletekben egy faktor independens terminátor kétirányú működését.

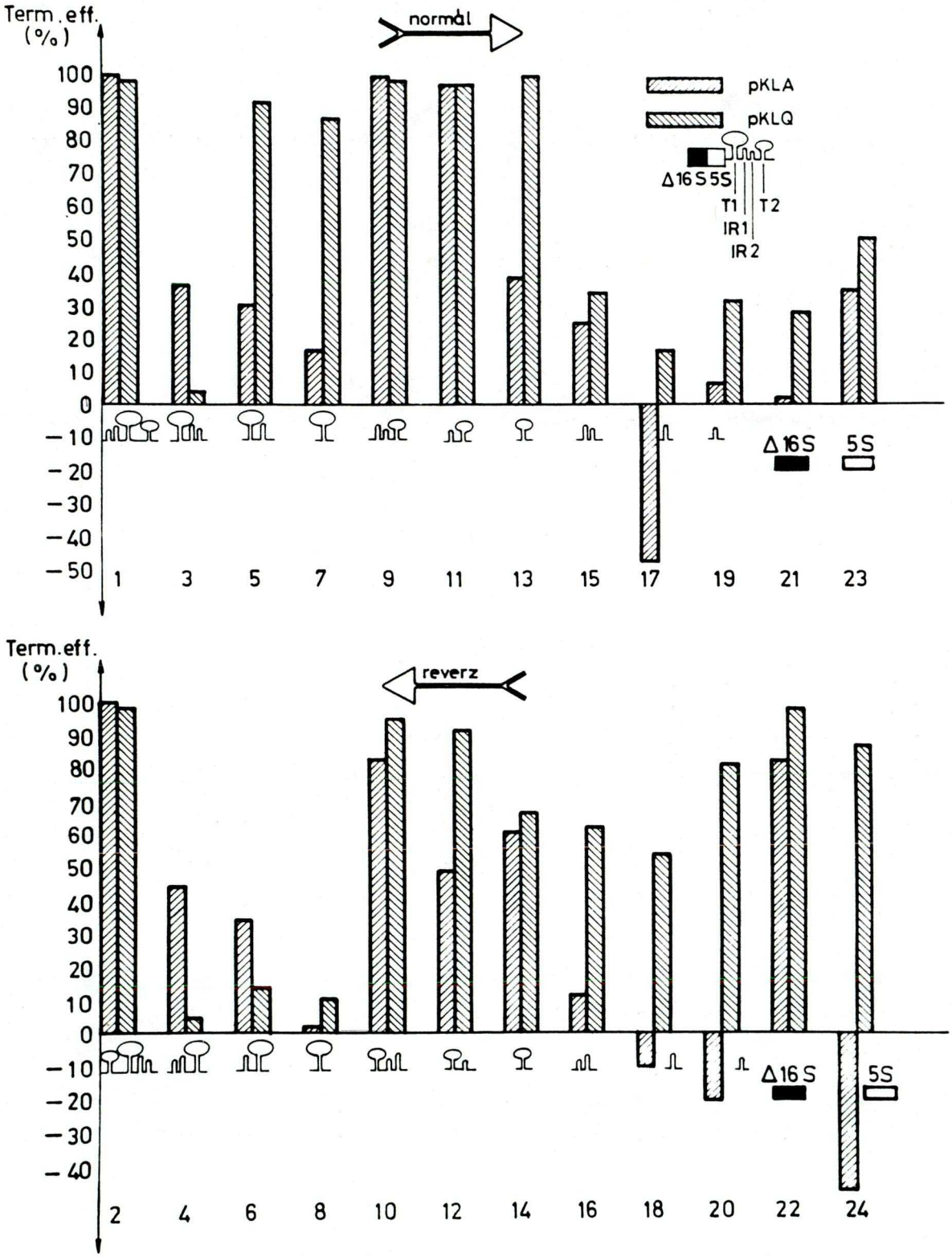
Mivel az rrnB T1 terminátor a fentiekhez hasonló szimmetriát mutat a GC-gazdag hajtűt követő T-sorozatot illetően, kíváncsiak voltunk, vajon efficiens terminátornak bizonyul-e fordított orientációban is, és ha igen, melyek a reverz irányú termináció struktúrális határai. A kérdések megválaszolására a Bal31 nukleázzal képzett T1 deléciós mutánsokat fordított orientációba beépítve pKL300 ΔH vektorunkba teszteltük az egyes konstrukciók in vivo terminációs aktivitását.

Meglepetésünkre mindegyik T1 mutáns rendkívül magas, 90% fölötti terminációs hatékonyságot mutatott (4 táblázat, 14. ábra). Mivel ez az erős terminátorokra jellemző hatékonyság azoknál a konstrukcióknál is megmaradt, melyekből az I-es típusú terminátorokra jellemző struktúrális sajátságok teljesen hiányoznak (pl. pKLT10), feltételezéseink szerint a reverz irányú terminációs képesség a T1 terminátor előtti 16S eredetű, vagy az 5S RNS-t kódoló szekvenciához rendelhető. (Logikailag nem zárható ki az a változat sem, hogy mindkét stabil RNS-t kódoló szekvencia hatékony reverz irányú terminátorokat tartalmaz.)

AZMID	TERMINÁTOR ELEMEK ÉS AZOK ORIENTÁCIÓJA	TRANSZLÁLT TERMINÁTOR ELEMEK	galK AKTIVITÁSOK (nmol/perc/OD_{650})	TERMINÁCIÓS HATÉKONYSÁGOK(%)
LQ1	T1,IR1,IR2(R),T2(N)	-	1,15	98,61
LQ2	T1,IR1,IR2(N),T2(R)	-	1,71	98,03
LQ3	T1,IR1,IR2(N)	-	131,93	4,28
LQ4	T1,IR1,IR2(R)	-	131,59	4,53
LQ5	T1,IR1(N)	-	9,77	91,71
LQ6	T1,IR1(R)	-	119,15	13,55
LQ7	T1(N)	-	28,41	87
LQ8	T1(R)	-	123,45	10,43
LQ9	IR1,IR2,T2(N)	-	2,31	98,53
LQ10	IR1,IR2,T2(R)	-	5,3	95,46
LQ11	IR2,T2(N)	-	3,345	97,58
LQ12	IR2,T2(R)	-	11,225	91,86
LQ13	T2(N)	-	0,205	99,86
LQ14	T2(R)	-	46,89	65,98
LQ15	IR1,IR2(N)	-	92,06	33,21
LQ16	IR1,IR2(R)	-	51,40	62,71
LQ17	IR1(N)	-	116,72	15,31
LQ18	IR1(R)	-	63,29	54,08
LQ19	IR2(N)	-	95,67	30,59
LQ20	IR2(R)	-	25,45	81,54
LQ21	Δ16S(N)	-	100,41	27,15
LQ22	Δ16S(R)	-	2,38	98,28
LQ23	5S(N)	-	68,35	50,41
LQ24	5S(R)	-	17,94	86,99
LQ2	-(lac promóter-ATG)	-	137,82	0

5. táblázat. A pKLQ plazmidcsalád tagjainak legfontosabb struktúrális sajátságai, transzlációs viszonyai, galaktokináz enzimaktivitás értékei, és terminációs efficienciái. Egyéb magyarázat a szövegben.

A kérdés eldöntésére a 16S és 5S DNS szekvenciákat BstNI enzimmel egymástól elválasztottuk, majd Klenow-polimerázzal feltöltve a ragadós végeket azokhoz HindIII linkereket kapcsoltunk (CAAGCTTG). HindIII emésztés után a fragmentumokat fordított orientációban klónoztuk a pKL300 ΔH és pKLO2 plazmidvektorok egyedi HindIII helyére. Látható (5. táblázat, 15. ábra), hogy a jórészt 16S eredetű szubfragment (pKLQ22), valamint a csupán 5S DNS szekvenciákat hordozó szubfragment (pKLQ24)



15. ábra. A pKLA és pKLQ plazmidcsalád terminációs efficencia értékei. Az értelmezéshez lásd még a 14. ábra magyarázatait is.

nemtranszlált állapotban képes a transzkripció hatékony, reverz irányú terminációjára. Mivel a nukleotidsorrend alapos analízise sem derített fel egyetlen I-es típusú terminátorokra jellemző motívumot sem az adott régióban, valószinű, hogy faktor dependens terminátorok játszanak központi szerepet a reverz irányú terminációs folyamatokban.

V.4.1. Az rrnB gén komplex terminátorrégiójának elemenkénti szubklónozása

A kísérletes munka következő szakaszában az rrnB gén komplex terminátorrégiójának elemenkénti izolálását, és szubklónozását tűztük ki célul. A Brosius és mtsai. (25) által meghatározott nukleotidsorrendből történő másodlagos RNS szerkezet predikció négy sajátságos RNS struktúra jelenlétét mutatta a gén 3' régiójában (8. ábra). Az 5S RNS génjét követő T1, és a tőle mintegy 130 nukleotid távolságra elhelyezkedő T2 faktor independens terminátorok között két ún. fordított ismétlődés (inverted repeat) szerkezet helyezkedik el (IR1, IR2).

A komplex régió elemenkénti in vivo analízisét a pKLT1 terminátorfragmentumból kialakított T1 deléciós mutánsok kis specifitású enzimekkel történő továbbhasításával, és a keletkező terminátorelemek szubklónozásával készítettük elő. Mivel előzetes kísérletekből kiderült, hogy mind a 16S, mind az 5S RNS-t kódoló szakasz fordított orientációban rendkívül hatékony - valószinűleg Rho-dependens - terminátorokat hordoz, a komplex T1, IR1, IR2, T2 elemeket tartalmazó rrnB gén 3' végi régió analíziséhez ezeket a terminátorokat el kellett távolítanunk.

A teljes, de struktúrgénektől "megtisztított" terminátorrégiót a pKLT1 framentum részleges BstNI enzimmel történő emésztésével alakítottuk ki. Az enzim közvetlenül a T1 terminátor előtt hasít, eltávolítva a terminációs hatékonyságmérés során zavaró 16S , és 5S eredetű reverz irányú terminátorokat. Bár egy BstNI hely lokalizáható a második inverted repeat, és a T2 terminátor között is, részleges BstNI emésztés után a teljes terminátorrégió önálló klónozása elvileg minden különösebb nehézség nélkül megoldható.

Így a pKLT1 plazmid terminátorfragmentumát BstNI enzimmel részlegesen emésztettük, majd a keletkezett szubfragmentumok 5' túlnyúló végeit Klenow-polimeráz segítségével tompa végekre töltöttük fel. A tompa végekhez T4 DNS ligáz segítségével HindIII linkereket (CAAGCTTG) kapcsoltunk, majd HindIII emésztést követően pKL300 ΔH vektorba inszertáltuk az in vitro manipulációval kialakított fragmentpopulációt. A ligátummal kompetens C600galK$^-$ baktériumokat transzformáltunk és egyedi baktériumkolóniákból olyan plazmidokat szelektáltunk, melyek a megfelelő méretű terminátorfragmentumot hordozták (pKLA1 és pKLA2 plazmidok, 228 bp-os inszertekkel).

Az inszertek szekvenciáját Maxam-Gilbert módszerrel ellenőriztük. A szekvenciaanalízis kimutatta, hogy bár a plazmidok a megfelelő méretű terminátorrégiót tartalmazzák, a szubfragmentek organizációja eltér az rrnB gén eredeti 3' végi szeveződésétől.

A klónokban a Brosius szerinti 6498-6776 pozíciók által kijelölt BstNI fragmentum megfordult és így kapcsolódott hozzá a helyes orientációjú T2 terminátorhoz (6776-6837). A terminátor szubfragmentek sorrendje tehát IR2(ford.), IR1(ford.), T1(ford.), T2(norm.) volt a pKLA1 plazmidban, míg a pKLA2 plazmidban T2(ford.), T1(norm.), IR1(norm.), IR2(norm.) sorrendet határoztunk meg. A rekombinánsok

ellenőrzése során nem találtunk olyan konstrukciót, mely megőrizte volna a komplex terminátorrégió eredeti szerveződését. Ezek az eredmények összhangban állnak Albrechsten és mtsai. (5) adataival, akik szintén sikertelenül próbálkoztak az eredeti sorrendű és hosszuságú komplex terminátorrégió klónozásával. A jelenség oka egyelőre nem tisztázott.

Az egyes terminátorelemek önálló klónozása, valamint a különböző terminátorelem kombinációk kialakítása során a továbbiakban is a fejezet elején vázolt módszert követtük. A konkrét konstrukciókban felhasznált kis specifitású restrikcós enzimeket, pKLT1 eredetű 3' végi deléciós mutánsokat, valamint a felhasználásuk révén kialakított terminátorfragmentumok legfontosabb sajátságait a 6. táblázat mutatja be.

V.4.2. A komplex rrnB terminátorrégió önálló elemeinek, és az elemek különböző kombinációinak in vivo analízise

A deléciós Bal31 mutagenezis és az azt követő kis specifitású enzimekkel való szubklónozás eredményeként előállított terminátorelemek in vivo hatékonyságát galaktokináz enzimaktivitás mérésekkel határoztuk meg.

A fragmentumokat a pKL300 ΔH terminátorszelekciós vektor lac promóter és galaktokináz riportergén közötti egyedi HindIII helyére építve mindkét lehetséges orientációban teszteltük. Hasonlóan jártunk el az elemek különböző kombinációját tartalmazó terminátormutánsok esetében is. Ezek a mutánsok, valamint a pKL300ΔH-ba beépített 16S eredetű és 5S RNS-t kódoló szekvenciák alkotják együttesen a pKLA plazmidcsaládot.

Plazmid	Startpont	Végpont	Fragmenthossz	Orientáció
pKLA1*,pKLQ1*	6610 (BstNI)	6838 (pKLT1)	228 bp	normál
pKLA2*,pKLQ2*	6610 (BstNI)	6838 (pKLT1)	228 bp	reverz
pKLA3, pKLQ3	6610 (BstNI)	6777 (pKLT3)	167 bp	normál
pKLA4, pKLQ4	6610 (BstNI)	6777 (pKLT3)	167 bp	reverz
pKLA5, pKLQ5	6610 (BstNI)	6741 (pKLT12)	131 bp	normál
pKLA6, pKLQ6	6610 (BstNI)	6741 (pKLT12)	131 bp	reverz
pKLA7, pKLQ7	6610 (BstNI)	6686 (pKLT4)	76 bp	normál
pKLA8, pKLQ8	6610 (BstNI)	6686 (pKLT4)	76 bp	reverz
pKLA9, pKLQ9	6689 (DdeI)	6838 (pKLT1)	149 bp	normál
pKLA10, pKLQ10	6689 (DdeI)	6838 (pKLT1)	149 bp	reverz
pKLA11, pKLQ11	6742 (HpaII)	6838 (pKLT1)	96 bp	normál
pKLA12, pKLQ12	6742 (HpaII)	6838 (pKLT1)	96 bp	reverz
pKLA13, pKLQ13	6778 (BstNI)	6838 (pKLT1)	60 bp	normál
pKLA14, pKLQ14	6778 (BstNI)	6838 (pKLT1)	60 bp	reverz
pKLA15, PKLQ15	6689 (BSTNI)	6777 (pKLT3)	88 bp	normál
pKLA16, pKLQ16	6689 (BSTNI)	6777 (pKLT3)	88 bp	reverz
pKLA17, pKLQ17	6689 (DdeI)	6741 (pKLT12)	52 bp	normál
pKLA18, pKLQ18	6689 (DdeI)	6741 (pKLT12)	52 bp	reverz
pKLA19, pKLQ19	6739 (HaeIII)	6777 (pKLT3)	38 bp	normál
pKLA20, pKLQ20	6739 (HaeIII)	6777 (pKLT3)	38 bp	reverz
pKLA21, pKLQ21	1598 (pKLT1)	6500 (BstNI)	207 bp	normál
pKLA22, pKLQ22	1598 (pKLT1)	6500 (BstNI)	207 bp	reverz
pKLA23, pKLQ23	6500 (BstNI)	6610 (BstNI)	110 bp	normál
pKLA24, pKLQ24	6500 (BstNI)	6610 (BstNI)	110 bp	reverz

A 6. táblázat a pKLA plazmidcsalád (pKL300 ΔH-ba épített terminátorok), és a pKLQ plazmidcsalád (pKL02-be beépített terminátorok) tagjainak legfontosabb sajátságait mutatja be.
* A pKLA1 és a pKLQ1 plazmidokban a fordított orientációban lévő 6610-6678-as pozíciók közötti BstNI fragmentumot a 6778-6838-as pozíciók közötti normál orientációjú BstNI fragmentum követte. Így a funkcionális terminátorelemek sorrendje IR2(rev.) - IR1(rev.) - T1(rev.) - T2(norm.) volt. Egyéb magyarázat a szövegben.

Mivel az egyedi konstrukciók terminációs efficiencia értékei eléggé hosszadalmas és körülményes leírással adhatók csupán meg, ehelyett a könnyebben áttekinthető, egyidejűleg több információt közlő (pl. orientáció, fragmentméret, terminációs elemek száma stb.) táblázatos, (5. táblázat.) és grafikus (15. ábra.) megjelenítést alkalmazzuk. A terminátor szubfragmentek in vivo hatékonyságának analízisére "Az eredmények megbeszélése" című fejezetben még visszatérünk.

V.5.1. A transzláció hatása a terminátoraktivitásra

A pKLA plazmidcsaládban az egyes terminátorkonstrukciókat a pKL300 ΔH vektor polilinkerébe, közvetlenül egy ép és funkcióképes riboszómakötő hely és AUG transzlációs iniciációs szignál mögé építettük be. Így a terminátorok (szekvenciájuktól függően) részben, vagy egészben transzlálódnak. Ez a szituáció lényegesen eltér azoktól a körülményektől, amelyekben a bakteriális, vagy fágterminátorok természetes viszonyok között működnek. Hayward és Wright (70) munkájából ismeretes, hogy számos I-es típusú terminátor működése tökéletesen felfüggeszthető, amennyiben a terminátort kódoló RNS rész transzlálódik. (ún. "readthrough" transzláció) Mivel ezt a zavaró effektust az egyes terminátormutánsok in vivo tesztelésekor mindenképpen ki akartuk szűrni, elkészítettük a transzlációs szignálok nélküli pKL02 vektort. Ebbe a terminátorszelekciós plazmidba építettük át az összes önálló terminátorelemet, az ezek kombinációjából készült mutánsokat, valamint a 16S eredetű, és 5S RNS-t kódoló fragmentumokat. Az így készült plazmidok együttese alkotja a pKLQ plazmidcsaládot. A plazmidcsalád egyes elemeinek galaktokináz aktivitás értékeit, terminációs hatékonyságát mutatja be az 5. táblázat, és a 15. ábra.

A pKLA és pKLQ plazmidcsalád ugyanazon elemeinek terminációs efficiencia értékeit összevetve következtetéseket vonhatunk le arra vonatkozóan, hogyan hat a terminátor RNS transzlációja a terminátoraktivitásra.

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGBESZÉLÉSE

Ebben a fejezetben az rrnB gén terminátorainak analízise során elvégzett kísérletek eredményeiből származó legfontosabb következtetéseket vesszük sorra. A diszkusszióban a prokarióta transzkripciós terminációs irodalom jelenlegi eredményeire támaszkodunk és amennyiben lehetséges, adatainkat összevetjük más szerzők hasonló jellegű munkáival is.

VI.1. Reverz irányú működőképes terminátorok azonosítása az rrnB operon struktúrgénjein belül

A kísérleteink során alkalmazott DNS fragmentum az rrnB operon komplex terminátorrégióján kívül tartalmazott még egy 190 bp hosszuságú darabot a 16S RNS-t kódoló szekvenciából, valamint a teljes 5S RNS gént meghatározó mintegy 130 bp-os DNS szakaszt. Az in vivo terminációs hatékonyságok mérésére használt galaktokináz aktivitásértékek analíziséből nyilvánvaló, hogy bár ezek a szegmensek normál orientációban nem fejtenek ki különösebb terminációs hatást (pKLQ21, pKLQ23, 15. ábra, 5. táblázat), fordított orientációban vizsgálva igen erős terminátorok (pKLQ22, pKLQ24, lásd mint fenn). Mivel sem a 16S eredetű, sem az 5S RNS-t kódoló szakaszon nem tudtunk egyetlen I-es típusú, faktor független terminátorokra jellemző szekvenciarészletet kimutatni, nagyon valószinű, hogy a terminációs hatásért a fragmentumon belüli Rho-dependens terminátorok felelősek. Korábbi kísérletekben Li és mtsai. (102) is találtak hasonló karakterű terminátorokat az rrnB gén 16S RNS-t kódoló DNS-ének P1P2 promóterekhez közelebb eső szakaszán. Az általuk lokalizált terminátor

a 16S DNS 1598-2166 nukleotidok közötti HindIII fragmentumára esik és fordított orientációban erőteljes poláris hatást fejt ki különböző promóterek (pl. lac, ara) mögé beépítve. A fragmentum terminációs hatása rho⁻ baktériumsejteken belül megszűnik, így azt minden bizonnyal Rho-dependens struktúrák idézik elő. Kísérleteinkben a 16S eredetű Rho-dependens terminátor pozícióját jóval precízebben határoltuk be. Az általunk elvégzett szubklónozási kísérletek és in vivo terminációs hatékonyságmérések eredményeiből nyilvánvaló, hogy a 16S eredetű reverz irányú terminációért a 1598 és 1787 nukleotidok közötti DNS szakasz a felelős.

További fordított irányú - minden valószinűség szerint szintén Rho-dependens terminátort - sikerült lokalizálnunk az 5S RNS-t kódoló szakaszon belül a 6499 és 6609 bp-ok közötti BstNI fragmentumon. S1 térképezéssel a 110 bp hosszúságú DNS-en belül két funkcionális terminátort mutattunk ki. Egyiknél közvetlenül egy GC-gazdag hajtű mögötti néhány nukleotidon (6565-6569), másiknál egy hosszabb nyél és hurokszerkezet hurkán belül (6540-6545) terminálódik az RNS lánc szintézise (Orosz A., nempublikált kísérletek). Felmerül a kérdés, van-e valamilyen funkcionális jelentősége az erőteljes másodlagos struktúrákkal rendelkező stabil RNS-eken belüli - eléggé gyakori - Rho-dependens terminátoroknak. Első pillanatban úgy tűnik, aligha. Ezek a gének normál orientációban rendkívül nagy gyakorisággal íródnak át (13,15) és a szomszédos genetikai egységekből induló esetleges fordított irányú transzkripciót erős, valószinűleg mindkét orientációban többé-kevésbé hatékony faktor independens rRNS terminátorok állítják le a stabil RNS gének határán.

Nem lehet azonban egyértelműen kizárni azt a lehetőséget sem, hogy

a baktériumok evolúciója során a stabil RNS gének egyike, vagy másika - transzpozíciós vagy rekombinációs események eredményeképpen - fordított orientációban egy másik transzkripciós egységbe kerülhetett át. Az ilyenfajta evolúciós próbálkozásból keletkező riboszómális antiszensz RNS viszont komoly problémákat okozhatna a finoman szabályzott stabil RNS szintézis regulációban. Lehetséges, hogy a 16S, 23S, illetve 5S RNS gének evolúciója úgy alakult, hogy még rövid részegységeik sem válhattak reverz orientációban új, a természetes szelekcióban kipróbálandó génkonstrukciók egy-egy moduljává a fent említett - a sejt számára létfontosságú - szabályozási mechanizmusok megbontása miatt. A Rho-dependens terminátorok reverz irányú "beépítése" a stabil RNS génekbe egy elvi lehetősége az anti-rRNS képződés kivédésére. A hipotézis igazolásában több stabil RNS génszakasz terminációs sajátságainak vizsgálata hozhatja meg a választ.

VI.2. Az komplex rrnB terminátorrégió önálló elemeinek terminációs hatékonysága

A komplex terminátorrégió moduljainak önálló in vivo terminációs hatékonyságát a "természetes" transzkripciós viszonyokat imitáló - normál orientáció, nemtranszlált terminátorelemek (5. táblázat, 15. ábra) - körülmények között meghatározva az ismert irodalmi adatoktól kissé eltérő következtetéseket vonhatunk le. A mérések szerint T2 terminátor önállóan is 100%-os efficienciájú (pKLQ14), míg a kiterjedtebb, magasabb termodinamikai stabilitású T1 terminátor hatékonysága némileg kisebb (pKLQ7, 87%). Szemikvantitatív irodalmi adatokból mindeddig úgy tudtuk (24) hogy a régió fő terminátora a T1,

s bár T2 szintén funkcióképes és meglehetősen erős terminátor, hatékonysága nem éri el a T1-ét. Bár Brosius az in vivo terminációs hatékonyságok meghatározására a mienktől eltérő plazmidvektort alkalmazott, ez azonban nem magyarázhatja a mérési adatok különbözőségét. Sokkal valószinűbb, hogy a terminációs hatékonyság értékek eltérései a vektorokba beépített terminátor szubfragmentekben keresendők. A fragmentumok kezdő és végpontjainak analíziséből kiderült, hogy ez a T1 esetében mindkét kísérleti rendszerben megegyezik, T2-nél viszont jelentős különbségek mutathatók ki. A T2 terminátor szubfragmentum kialakítása során a terminátor közvetlen közelében elhelyezkedő bizonyítottan működőképes P_{ORFII} promótert egy restrikciós hasítással (az ún. X-enzimmel) eltávolítottuk, s csak azután ültettük be terminátorszelekciós vektorunkba. Brosiusnál a T2 terminátort tartalmazó restrikciós fragmentum a P_{ORFII} mögé nyúlik, erről a promóterről a tesztelő plazmidvektorban transzkripció indulhat. A P_{ORFII} promóterről átíródó riportergén megemelkedett aktivitása viszont a tesztelt terminátorfragmentum kisebb hatékonyságaként is interpretálható.

A terminátorok közötti fordított ismétlődések (IR1 és IR2) önállóan, és együttesen is csupán enyhe terminációs efficienciát mutatnak (pKLQ15, pKLQ17, pKLQ19, 15-33%).

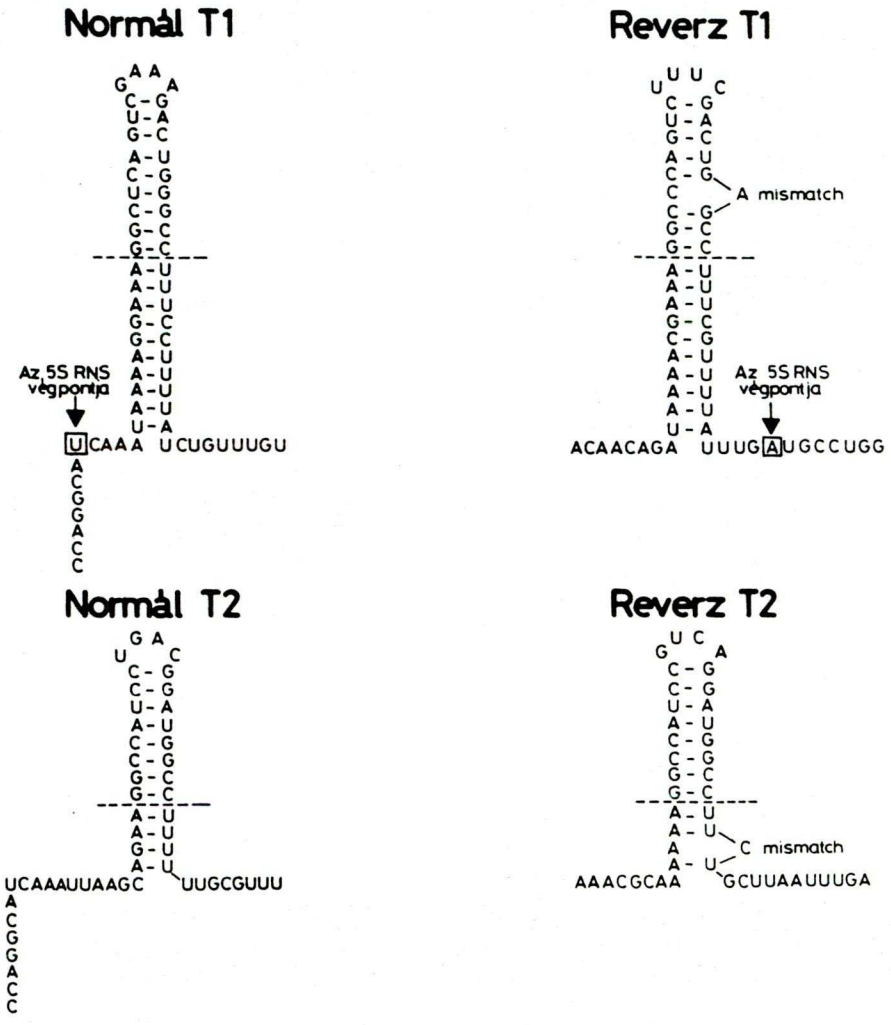
Az IR1 és IR2 - egy konstrukció kivételével - sem T1 mögé beépítve, sem T2 elé inszertálva nem változtatja meg különösebben a terminátorok erősségét (pKLQ5, pKLQ9, pKLQ11). A pKLQ3 plazmid esetében tapasztalható nagyfokú aktivitásesés viszont némileg meglepő (4.28%). A jelenség oka ma még nem tisztázott, magyarázatára logikailag négy lehetőség tételezhető fel:

1. A T1 mögé beépített két inverted repeat struktúra úgy változtatja meg a képződő RNS lánc másodlagos, vagy harmadlagos (térbeli) szerkezetét, hogy az a továbbiakban nem képes terminátorfunkciót betölteni.
2. A T1 terminátorban bekövetkezett mutáció okozza (pl. rövid deléció, vagy AT/GC báziscserék a terminátor hajtűben).
3. A vektor vad tipusú lac promóterének mutációja során egy erősebb promóter képződött, mely a terminátorokat hatékonyabban írja át.
4. Mutáció következett be a transzkripciós iniciációs pont környékén (+1 és +30 nukleotidok között), mely ún. faktor independens antiterminációs mechanizmus kialakításával (59,181) biztosítja az egyébként efficiens terminátorszerkezet átírását. Az aktivitáscsökkenés tényleges okát a konstrukció további analízise (pl. szekvenciameghatározás a promóter, és terminátorrégió környékén) tárhatja majd fel.

VI.3. Szimmetrikusak-e a terminátorok?

Az in vivo terminációs hatékonyságok mérése egyértelműen igazolta, hogy a komplex terminátorrégió önálló elemei nem szimmetrikusak (5. táblázat, 15. ábra). Fordított orientációban a T2 terminátor hatékonysága 100%-ról 66%-ra esik le (pKLQ14), míg a T1 efficienciája 87%-ról 11%-ra csökken (pKLQ8). A két terminátor normál és fordított orientációban kialakuló RNS másodlagos szerkezetének összehasonlítását a 16. ábrán mutatjuk be.

Az in vivo terminációs efficiencia értékek és az RNS másodlagos szerkezetek ismeretében igen valószinű, hogy a T2 terminátor esetében



16. ábra. A normál és reverz orientációjú T1 és T2 terminátorok másodlagos szerkezete. A hajtűk szaggatott vonal alatti része a terminátorok AT-gazdag, az e fölötti szekvencia a hajtűk GC-gazdag részét mutatja. A reverz orientációjú T1 GC-gazdag hajtűjének közepén egy bázispárosodásra alkalmatlan C:A nukleotidpár helyezkedik el. Egyéb magyarázat a szövegben.

tapasztalható kisebb mértékű aktivitásesésért az RNS hajtű nemszimmetrikus elemei a felelősek. A kialakuló T2 hajtű szárán belül a bázispárosodás mindkét orientációban tökéletes, de teljesen eltérő a hajtű két szára közötti hurok bázissorrendje. Ugyancsak más az RNS

lánc nukleotidsorrendje a stem and loop struktúra előtt és mögött. Ezek a különbségek bőségesen indokolják, miért ismeri fel kisebb hatékonysággal a terminációs szignált a transzkripciót végző RNS-polimeráz.

A T1 terminátor esetében bekövetkező drasztikus aktivitásesésnek a fentieken túl más okai is vannak. T1 két másodlagos szerkezetéből világosan látszik, hogy normál orientációban a nyélben a bázispárosodás tökéletes, addig fordított orientációban a hajtű GC-gazdag részének közepe táján egy párosodásra alkalmatlan C és A nukleotid áll egymással szemben. Ez az egyetlen párosodási hiba a másodlagos struktúra termodinamikai stabilitásának olymértékű csökkenéséhez vezethet, hogy az terminátorfunkcióját már nem képes betölteni. Hasonló jelenség egyébként éppen csoportunkban végzett kutatások eredményeként vált ismertté az irodalomban (17).

Érdekes megjegyezni, hogy a terminátorok közötti inverted repeatek (IR1 és IR2) megfordítása jelentősen megnöveli mindkét elem terminációs hatékonyságát (pKLQ18, pKLQ20).

VI.4. A transzláció hatása a terminációra

Kísérleteink megerősítik Hayward és Wright, valamint Roland és mtsai (70,149) eredményeit, mely szerint a terminátorelemek transzlációja erőteljesen csökkenti a termináció in vivo hatékonyságát (4. és 5. táblázat, valamint 15. ábra). Régebbi irodalmi adatok alapján sokáig az az elképzelés élt a köztudatban, hogy a transzláció csupán Rho-dependens terminátorok működését képes felfüggeszteni. A fenti szerzők bizonyították, hogy ez faktor független terminátorok esetében is igaz.

Kísérleteink egyértelműen igazolták, hogy a T2 transzlált változatának (pKLA13) terminációs hatékonysága jelentősen csökkent a nem transzlált T2-höz (pKLQ13) képest (100%-ról 39%-ra). T1 esetében ugyanezek a mutatók még jelentősebb aktivitásesést demonstráltak (87%-ról 11%-ra).

A jelenség magyarázata, - melyet már a korábban említett szerzők is felvetettek - hogy a transzláció során a képződő RNS láncon az RNS-polimeráz közelében lévő riboszómák sztérikus okok miatt megakadályozzák, hogy a terminátor RNS másodlagos szerkezetek kialakuljanak. Valószinűleg arról van szó, hogy a riboszómák lefedik a terminátor hajtűjének felfutó szárát, amelyet a később kialakuló lefutó szár - a riboszómákkal való "álcázás" miatt - már nem képes felismerni.

Érdekes megjegyezni, hogy három esetben (pKLA3, pKLA4, pKLA6) a transzláció megnövelte a T1 terminátor és egy, vagy két inverted repeat egyébként rendkívül alacsony terminációs hatékonyságát. Ennek a paradox hatásnak a mechanizmusát egyelőre nem ismerjük.

Még inkább zavarbaejtő jelenség a pKLA17, pKLA18, pKLA20, és pKLA24-es klónok esetében tapasztalható "negatív" termináció. Míg ugyanezen plazmidkonstrukciók nemtranszlált változatai (pKLQ17, pKLQ18, pKLQ20, és pKLQ24) különböző szintű terminációs aktivitást mutatnak az általuk hordozott terminátorelemektől függően - IR1, IR2, illetve az 5S RNS fordított orientációjú Rho-dependens szignáljai - a transzlált változatok galaktokináz értékei magasabbak, mint a lac promóteres kontrollplazmidé (pKL300 ΔH). Mai tudásunk alapján két formális lehetőség adódik a meglepő eredmények magyarázatára. Az egyik szerint lehetséges, hogy a transzlált mRNS-ek valamiféle "retroaktív" struktúrális sajátsága növeli meg a vektorplazmidban alkalmazott

promóter erősségét. Bár számos esetben demonstrálták már a promóter mögötti szekvenciák promótererősséget befolyásoló hatását (5,181), esetünkben ez a változat kevéssé valószinű. Nehéz ugyanis megnyugtató magyarázatot találni arra a tényre, hogy az erősítő hatás csak akkor érvényesül, ha a messenger RNS transzlált.

A második - jóval valószinűbb - elképzelés szerint a hatás a mRNS megnövekedett stabilitásával magyarázható. A transzlációt végző riboszómákkal beborított struktúrák erőteljesen gátolhatják a messenger RNS in vivo lebontását, megnövelve ezáltal a galaktokináz aktivitás értékeket.

VI.5. A T1 terminátor csonkításának hatásai

Bár kevés szisztematikus tanulmány foglalkozik a terminátor hajtűstruktúrája utáni T-sorozat szerepének tisztázásával, különböző forrásokból származó bizonyítékok alapján az irodalomban általánosan elfogadott az a nézet, hogy a hosszabb T-sorozat erősebb terminációt biztosít (1,54,136). Az egyetlen részletes analízist a trp attenuátor T-sorozatáról közölték a közelmúltban (107). A szerzők azt találták, hogy a 9 timidinből 1-3 eltávolítása nem befolyásolta a termináció efficienciáját, 4-6 timidin deléciója lineáris csökkenést okozott, míg több mint 6 timidin eltávolítása teljes funkcióvesztést eredményezett.

A fenti adatokkal ellentétben az 4. táblázat, és a 14. ábra eredményei szerint a T1 terminátor 11 tagú T-sorozatából 9 timidin eltávolítása csupán részleges terminációs hatékonyságbeli csökkenést idézett elő (pKLT19, 31%). Minden valószinűség szerint a maradék terminációs aktivitás a T1 hajtű, és a megmaradt 2 T-nukleotidnak köszönhető. Fordított orientációban ez a deléciós mutáns (pKLT21)

tökéletesen aktív, de ahogyan azt már a diszkusszió korábbi részében megállapítottuk, ez a terminációs hatás főleg a 16S, és 5S eredetű szakaszok Rho-dependens terminátoraihoz köthető.

Érdekes módon a csonka, fordított orientációjú, és csupán részlegesen funkcionáló terminátor esetében az S1 nukleázos vizsgálatok alapján a terminációs végpontok az ép, és normál orientációjú T1-hez rendkívül hasonló mintázatot mutatnak (Orosz A. nempublikált kísérletek).

A normál orientációjú T1-nél a termináció a T-gazdag régió több nukleotidjánál is bekövetkezhet (6652-6669 nukleotidok közötti szakaszon). Emellett találtak olyan transzkriptumot, mely meglepő módon a hajtűszerkezet hurkán belül terminálódott (162).

Fordított orientációban a csonka T1 terminációs végpontjai mintegy 20 nukleotid hosszuságú régiót fednek le (6629-6610), mely tükörszimmetrikusan szinte tökéletesen megegyezik az ép és normál orientációjú T1 terminációs végpontjaival. Találtunk több ponton (6643-6641 nukleotidok között) a hajtűszerkezeten belül terminálódott transzkriptumokat is.

Amennyiben a T1-nél normál, és reverz orientációban a hurkon belül terminálódott messengerek léte nem bizonyul kísérleti artefaktumnak (mely egyaránt származhat az RNS preparátum nyomnyi RN-áz szennyezéséből, vagy az S1 nukleáz hibás működéséből) érdekes lenne megvizsgálni, ezek milyen - a jelenleg elfogadott terminációs modellektől bizonyosan eltérő - mechanizmus útján keletkeztek.

VI.6. Miért kell két terminátor?

A tények ismeretében, hogy:

1. az rrnB T1, és T2 terminátorok önállóan is tökéletesen hatékonyan működnek,
2. a többi riboszómális RNS gén 3' végét csupán egyetlen terminátor zárja le,
3. az rrnB terminátorrégió két inverted repeat struktúrája (IR1 és IR2) nem hatékony transzkripciós terminátorok,

valószinűnek látszik, hogy az rrnB operon komplex transzkripciós terminátorrégiója inkább véletlenszerűen, mintsem valamilyen biológiai igény szelektív hatására alakult volna ki. Figyelembe véve, hogy a T2 terminátor szekvenciája majdnem teljesen azonos az rrnG gén terminátorával, valamint, hogy a T1 és az rrnD terminátorai rendkívüli mértékben homológok, az rrnB komplex terminátorrégió kialakulását a következőképpen magyarázhatjuk:

Az eredeti, csupán egy terminátoros (T2) rrnB operon génduplikáció során jöhetett létre a hozzá leginkább hasonló rrnG gén kópiájából, majd az E. coli kromoszóma egy másik lokuszát foglalta el. A T1 terminátor inszerciója az 5S RNS génje és a T2 terminátor közé egy későbbi transzpozíciós esemény eredménye lehetett, ahogyan azt már korábban Brosius és mtsai. is felvetették (25).

VI.7. Az rRNS operonok terminátorainak specifikus tulajdonságai

Az 1990-es év közepéig csaknem az összes E. coli riboszómális RNS operon 3' végi szekvenciája ismertté vált. A hét terminátorrégió közül hat nukleotidsorrendjét már meghatározták, (rrnB 25, rrnC 192, rrnD 45, rrnE 103, rrnG 168, rrnH 166), csupán az rrnA terminátor analízise maradt hátra.

A szekvenciaadatok alapján ezek mindegyike az I-es típusú (faktor független) terminátorok csoportjába tartozik (1,54,135,136) és közös sajátságuk, hogy hosszú, nem transzlált operonok 3' végét jelölik ki. Az operonok géntermékei riboszómális, és transzfer RNS molekulák, melyek kiterjedt másodlagos szerkezettel rendelkeznek. Az ma már - a különböző irodalmi forrásokból származó bizonyítékok alapján - elfogadott tény, hogy az rrn gének transzkripciójának folyamatosságát specifikus antiterminációs rendszer biztosítja (115 és hivatkozásai). Ez az antitermináció a riboszómális és transzfer RNS-ekből kialakuló másodlagos szerkezetek terminációs hatását függeszti fel.

Mivel az rrn terminátorok hatékonyan állítják le az antiterminálódott transzkripciót, több szerző vetette fel azt a lehetőséget, hogy ezek a struktúrák rendkívül erős, antitermináció rezisztens ún. "szuperterminátorok" (lásd mint fenn, 115). Bár a kísérleti bizonyitékok nem teljesen ellentmondásmentesek ennek igazolásában, a priori feltételezések alapján igen valószinű, hogy a terminátoroknak rendelkezniük kell ezzel a különleges sajátsággal.

Több szerző az aktuálisan rendelkezésre álló szekvenciaadatok összehasonlításával homológ szekvenciarészeket derített fel a terminátorokon belül, és azok közvetlen környezetében (103), de ezek a

vizsgálatok - mivel korlátozott számú rrn terminátort vettek alapul - nem mondhatták ki a végső szót a hipotézis igazolásában.

Mivel mára már csupán egyetlen rrn terminátor nukleotidsorrendjét nem ismerjük, a rendelkezésre álló hét hasonló karakterű terminátor összehasonlításával mélyebb összefüggések tárhatók fel a szuperterminációról struktúrális okairól. Az analízist elvégezve a szekvencia, és RNS másodlagos szerkezetbeli hasonlóságok alapján a következő főbb konklúziók vonhatók le (7. táblázat, 17. ábra.):

rrnB T1 CAT/CAAATAAAACGAAAggctcagtcgaaagactgggccTTTCGTTTTA(TCTG)TTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAT

rrnD CAT/CAAATAAAACAAAAggctcagtcggaagactgggccTTTTGTTTTA(TCTG)TTGTTTGTCGGTGAACACTCTCCCGPuG

rrnE CAT/CAAATTAGAAAAAccccggtccataaggccggggTTT(TTTG)CATATCAATTATTTGCATGATGAAGGGAATCTTCATG

rrnH CCA/CTTATTAAGAAgcctcgagttaacgctcgaggTTTTTTTTCG(TCTG)TATATCTATTATTGCCAGAATCGCAAAAA

rrnC CCA/GAAATCATccttagcgaaagctaaggATTTTTTTTA(TCTG)AAATAACCCTCTCCGAAGTAAATCCTTCT

rrnG CAT/CAAAATTATGCGAAAggccatcctgacggatggccTT(TTTG)CATTGGCGGCGCAGAAAAAAATGCCTG

rrnB T2 CAT/CAAATTAAGCAGAAggccatcctgacggatggccTT(TTTG)CGTTTCTACAAACTCTTCCTGTCG

17. ábra. Az ismert E. coli rrn riboszómális RNS terminátorok összehasonlítása. A / jel előtt a terminátorokat megelőző 5S RNS ill. transzfer RNS-ek utolsó néhány nukleotidját adtuk meg. A hajtűképzésre alkalmas szekvenciákat aláhúzással jelöltük. A hajtűszerkzeteken belül az erősebb bázispárosodásra képes GC-gazdag részeket kisbetűkkel szedtük. Aláhúzás nélküli kisbetűk jelzik a terminátorok hurokszerkezetét. A kerek zárójeleken belüli nukleotidok az összes riboszómális RNS terminátorra jellemző TYTG motivumot mutatják. Egyéb magyarázat a szövegben.

1. Mindegyik rrn terminátort erőteljes másodlagos szerkezettel rendelkező, nem transzlált RNS géntermék előzi meg. Négy esetben ez 5S RNS, két esetben tRNS, és egy - kivételnek tekinthető - esetben egy másik terminátor.

2. Az rrn terminátorok hajtűstruktúrája meglehetősen komplex. A hajtű nyele minden esetben két részre osztható. Az alsó 4-11 bázispár hosszuságú szakasz AT-gazdag. Az A

OPERON	KROMOSZOMÁLIS POZÍCIÓ	A TERMINÁTOR ELŐTT	A TERMINÁTOR MÖGÖTT	A HAJTŰ AT-GAZDAG RÉSZE(W)	A HAJTŰ GC-GAZDAG RÉSZE(Y)	HUROK	T-SOROZAT(Z)	TYTG MOTÍVUM	A TERMINÁTOR KÖRNYEZETE	A TRANSZKRIPCIÓ IRÁNYA(X)
rrnA	87'	-	-	-	-	-	-	-	-	-
rrnB T1	90'	5S	T2	11/2	9/3	GAAA	11/2 a hajtűben, 9/3 utána	TCTG	rrnD és rrnE-hez hasonló	m
rrnB T2	90'	T1	birA gén	4/1	8/2	TGAC	5/0, 4 a hajtűben	TTTG	rrnG-hez hasonlít	m
rrnC	85'	$tRNS^{Trp}$	-	10/3, 1 hibával	7/3	GAAA	8/0 a hajtűben, 1 hibával	TCTG	részleges homológia rrnH-val	m
rrnD	72'	5S	-	11/1	9/3	GGAA	11/1 a hajtűben 9/3 utána	TCTG	rrnB és rrnE-hez hasonló	e
rrnE	90'	5S	ismeretlen fehérje génje	5/0	8/1 vagy 9/1 1 hibával	CATAA vagy ATAA	6/0 5 T a hajtűben	TTTG	rrnB és rrnD-hez hasonló	m
rrnG	56'	5S	ismeretlen fehérje génje	4/1	8/2	TGAC	5/0 4 T a a hajtűben	TTTG	rrnB T2-höz hasonlít	e
rrnH	5'	$tRNS^{Asp}$	ismeretlen fehérje génje	5/1	9/3	TAAC	8/0 5 T a a hajtűben	TCTG	részleges homológia rrnC-vel	m

Jelmagyarázat: W = AT/GC nukleotidok száma a hajtű AT-gazdag szakaszán, Y = GC/AT nukleotidok száma a hajtű GC-gazdag szakaszán, Z = T/egyéb nukleotidok száma a T-sorozatban, X = az óramutató járásával megegyező (m) ill. ellentétes irányú (e) transzkripció, - = egyelőre ismeretlen adatok

7. táblázat. Az E. coli rrn operonok transzkripciós terminátorainak összehasonlítása.

nukleotidok főleg a nyél felszálló szárában, míg a T nukleotidok a nyél leszálló szárában helyezkednek el és egymással tökéletes bázispárosodásra képesek. Ez a specifikus struktúrális sajátság felveti azt a lehetőséget, hogy a terminátorok mindkét orientációban hatékonyan működhetnek (lásd pl. 136).

Figyelembe véve a T1 terminátorral végzett in vivo kísérletek adatait, valamint azt a tényt, hogy az rrn terminátorok többsége mögött 50-200 bp-nyi távolságra, a riboszómális RNS génekkel megegyező irányba átíródó fehérjekódolásra alkalmas szekvenciák

vannak, a kétirányú termináció jelensége erőteljesen megkérdőjelezhető. Mindezek mellett egy esetleges ellentétes irányú transzkripció hatása valószinűleg pusztán az erős rrn promóterekről induló transzkripció, és DNS templát RNS-polimeráz telítettség miatt még terminátorok hiányában sem érvényesülhetne ezekben az operonokban. A fenti meggondolások miatt a hajtű AT-gazdag része tehát nem feltétlenül egy kétirányú terminációra mutató struktúrális jegy, inkább az tekinthető az az rrn operonokat jellemző belső tulajdonságnak. A hajtű GC-gazdag része semmilyen különleges jellegzetességet nem mutat. Ez a szakasz általában 7-9 tökéletesen párosodott nukleotidból áll, melyekben a hét ismert szekvenciájú rrn terminátornál szembeötlő homológia nem fedezhető fel.

3. A terminátorok hajtűjének hurka négy bázispár hosszuságú. Első pillantásra feltűnő sajátság a hurkok purin gazdagsága. Az első pozícióban négy terminátor esetében purin, háromnál a rendkívül sokrétű bázispárosodásra képes uridin található. A második pozícióban hat esetben purin, míg egy esetben uridin helyezkedik el, a hurok harmadik - rendkívül konzervatív - pozíciójában minden esetben uridin áll. A negyedik pozíciót öt alkalommal adenin, három alkalommal citozin foglalja el.

Ez a purin gazdag hurok lehet egy eleme annak a többkomponensű komplex, és dinamikus struktúrának, melyre az rrn terminátorok funkcionális jellegzetességei visszavezethetők.

4. A TCTG motívum (melyet már korábban is a riboszómális, és néhány fágterminátor részének tekintettek) a terminátor hajtűk T-sorozatának közvetlen közelében helyezkedik el. Három esetben a TTTG tetranukleotid helyettesíti az eredeti szekvenciát.

5. Az rrnB gén komplex terminátorrégiója - ahogyan azt már a diszkusszió korábbi fejezetében láthattuk - valószinűleg inkább véletlenszerű, mintsem funkcionális igények szelekciójának hatására alakult ki.

Jelenlegi ismereteink alapján nem lehet célunk, hogy a riboszómális RNS operonok terminációjának végérvényes, és minden tekintetben korrekt modelljét kidolgozzuk. A rendelkezésünkre álló szekvencia, és másodlagos szerkezet adatok alapján azonban joggal feltételezhetjük, hogy a fent összegyűjtött és összességében csak az rrn operonok terminátoraira jellemző sajátságok felelősek a "szuperterminációért" jelenségéért. Az RNS-polimeráz és az AT-gazdag terminátor hajtű, valamint a purin gazdag hurokszerkezet közötti specifikus kölcsönhatások - eddig még nem tisztázott módon - előidézhetik az antiterminációban résztvevő járulékos fehérjefaktorok disszociációját a transzkripciós komplexből. Más, eddig még nem karakterizált terminációs proteinek kötődhetnek a terminátorok egyéb elemeihez (pl. a TCTG motívumhoz), ezzel biztosítva az RNS-polimeráz szignálfelismerését, és felhasználását. Az erőteljes másodlagos szerkezettel rendelkező 5S RNS vagy tRNS és a terminátorok közötti RNS-RNS kölcsönhatásoknak szintén kulcsszerepük lehet a folyamatban.

Bármi legyen azonban ez a mechanizmus, az rrn operonok terminációjának széles körben elfogadott, és korrekt modellje csupán a specifikus fehérje-RNS, és RNS-RNS kölcsönhatások, valamint a régió harmadlagos RNS szerkezetének figyelembevételével alakítható csak ki (44,99,138,139,164,177,185).

Az elkövetkező évek kutatásai valószinűleg számos meglepetést tartogatnak még az itt dolgozó szakemberek számára és több ponton gyökeresen átalakítják majd a transzkripció terminációjáról érvényben lévő jelenlegi elképzeléseket.

VII. IRODALOMJEGYZÉK

1. Adhya, S., Gottesman, M. (1978). Control of transcription termination. Ann. Rev. Biochem. 47, 967-996.

2. Adhya, S., Gottesman, M. and de Crombrugghe. B. (1974). Release of polarity in E. coli by gene N of phage lambda. Termination and antitermination of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71, 2534-2538.

3. Adhya, S., Sarkar, D., Valenzuela, D. and Maitra, U. (1979). Termination of transcription by Escherichia coli RNA polymerase: Influence of secondary structure of RNA transcripts on Rho-dependent termination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 3331-3335.

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

5. Albrechtsen, B., Squires, C. L., Li, S. and Squires, C. (1990). Antitermination of characterized transcriptional terminators by the Escherichia coli rrnG leader region. J. Mol. Biol. 213, 123-134.

6. Ames, B. M., Tsang, T. H., Buck, M. and Christman, M. F. (1983). The leader mRNA of the histidine attenuator region resembles tRNA his; possible general regulatory implications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 5240-5242.

7. Andrews, C. and Richardson, J. P. (1985). Transcription termination factor rho mediates simultaneous release of RNA transcripts and DNA template from complexes with Escherichia coli RNA polymerase. J. Biol. Chem. 260, 5826-5831.

8. Arndt, K. M. and Chamberlin. M. J. (1990). RNA chain elongation by Escherichia coli RNA polymerase. Factors affecting the stability of elongating ternary complexes. J. Mol. Biol. 213, 79-108.

9. Bertrand, K., Korn, L. J., Lee, F. and Yanowsky, C. (1972). The attenuator of the tryptophane operon of Escherichia coli: Heterogenous 3'-OH termini in vivo and deletion mapping of functions. J. Mol. Biol. 117, 224-247.

10. Besemer, J. and Herpers, I. (1977). Suppression of polarity of insertion mutation within the gal operon of E. coli. Mol. Gen. Genet. 151, 295-304.

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

12. Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Green, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H. and Falkow, S. (1977). Construction and characterization new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene. 2, 95-113.

13. Boros, I. (1984). Escherichia coli riboszómális RNS operon promótereinek izolálása, azonosítása és felhasználása in vitro DNS rekombinációval. Kandidátusi értekezés.

14. Boros, I., Csordás-Tóth, É., Kiss, A., Kiss, I., Török, I., Udvardy, A., Udvardy, K. and Venetianer, P. (1983). Identification of two promoters probably involved in the transcription of a ribosomal RNA gene of Escherichia coli. Biochem. Biophys. Acta. 739, 173-180.

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

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

17. Boros, I., Pósfai, G. and Venetianer, P. (1984). High-copy-number derivatives of plasmid cloning vector pBR322. Gene. 30, 257-260.

18. Bossi, L. and Ciampi, M. S. (1981). DNA sequences at the sites of 3 insertions of the transposable element Tn5 in the histidine operon of S. typhimurium. Mol. Gen. Genet. 183, 406-408.

19. Brendel, V., Hamm, G. H. and Trifonov, E. (1986). Terminators of transcription with RNA polymerase from Escherichia coli: What they look like and how to find them. J. Biomol. Struct. Dyn. 3, 705-723.

20. Brendel, V. and Trifonov, E. (1984). A computer algorithm testing potential prokaryotic terminators. Nucl. Acids Res. 12, 4411-4427.

21. Brennan, C. A., Dombroski, A. J. and Platt, T. (1987). Transcription termination factor Rho is an RNA-DNA helicase. Cell. 48, 945-952.

22. Briat, J.-F., Bollag, G., Kearnery, C., Molineux, I. and Chamberlin, M. (1987). Tau factor from Escherichia coli mediates accurate and efficient transciption termination at the bacteriophage T3 early termination site in vitro. J. Mol. Biol. 198, 43-49.

23. Brosius, J. (1984). Plasmid vectors for selection of promoters. Gene. 27, 151-160.

24. Brosius, J. (1984). Toxicity of an overproduced foreign gene product in Escherichia coli and its use in plasmid vectors for the selection of transcription terminators. Gene. 27, 161-172.

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

26. Burt, D. W. and Brammar, W. J. (1982). Transciption termination sites in the b2 region of bacteriophage lambda that are unresponsive to antitermination. Mol. Gen. Genet. 185, 462-467.

27. Chamberlin, M. J. (1974). The selectivity of transcription. Ann. Rev. Genet. 43, 721-775.

28. Chen, C.-Y., Galluppi, G. R. and Richardson, J. P. (1986). Transcription termination at lambda tR1 is mediated by interaction of rho with specific single-stranded domains near the 3' end of cro mRNA. Cell. 46, 1023-1028.

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

30. Clewell, D. B. and Helinski, D. R. (1972). Effect of growth conditions on the formation at the relaxation complex of supercoiled ColE1 deoxiribonucleic acid and protein in Escherichia coli. J. Bacteriol. 110, 1135-

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

32. Court, D., Brady, C. Rosenberg, M., Wulff, D. L., Behr, M., Mahoney, M. and Rumi, S. (1980). Control of transcription termination: A rho-dependent termination site in bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 138, 231-254.

33. Csordás-Tóth, É., Boros, I. and Venetianer, P. (1979). Structure of the promoter region for the rrnB gene in E. coli. Nucl. Acids Res. 7, 2189-2197.

34. Daniels, D. L., Schroeder, J. L., Blattner, F. R., Szybalski, W. and Sanger, F. (1983). Lambda II. Cold Spring Harbor, New York.

35. Das, A., Court, D. and Adhya, S (1976). Isolation and characterization of conditional lethal mutants of Escherichia coli defective in transcription termination factor rho. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 1959-1963.

36. Das, A., Court, D., Gottesman, M. and Adhya, S. (1977). Polarity of insertion mutations is caused by rho-mediated termination of transcription. in. DNA insertion elements, plasmids, and episomes. ed. Bukhari, A. L. et. al., p. 93., C.S.H.L., C.S.H., N.Y.

37. Das, A., Merril, C. and Adhya, S. (1978). Interaction of RNA polymerase and rho in transcription termination: coupled ATPase. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 75, 4828-4832.

38. de Boer, H. A. (1984). A versatile plasmid system for the study of prokaryotic transcription signals in Escherichia coli. Gene. 30, 251-255

39. de Crombrugghe, B., Adhya, S., Gottesman, M. and Pastan, I. (1973). Effect of the rho on transcription of bacterial operons. Natl. New Biol. 241, 260-264.

40. de Crombrugghe, B., Mudryj, M., Di-Laura, R. and Gottesman, M. (1979). Specificity of the bacteriophage lambda N gene product (pN): nut sequences are necessary and sufficient for the antitermination by pN. Cell. 18, 1145-1151.

41. Deuschle, U., Gentz, R. and Bujard, H. (1986). lac repressor blocks transcribing RNA polymerase and terminates transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 4134-4137.

42. Deuschle, U., Hipskins, R. A. and Bujard, H. (1990). RNA polymerase II transcription blocked by Escherichia coli lac repressor. Science. 248, 480-483.

43. Drahos, D. and Szybalski, W. (1982). Synthesis of the nutL DNA segments and analysis of antitermination and termination in coliphage lambda. Gene. 18, 343-354.

44. Draper, D. E. (1989). How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins. Trends Biochem. Sci. 14, 335-338.

45. Duester, G. L. and Holmes, W. M. (1980). The distal end of the ribosomal RNA operon rrnD of Escherichia coli contains a $tRNA_1^{thr}$ gene, two 5S rRNA genes and a transcription terminator. Nucl. Acids Res. 8, 3793-3807.

46. Dunn, J. J. and Studier, F. W. (1980). The transcription termination site at the end of the early region of bacteriophage T7 DNA. Nucl. Acids Res. 8, 2119-2132.

47. Elfrod, R. M. and Holmes, W. M. (1983). Fusion the tandem Escherichia coli rrnA promoters to a transcription termination signal from the end of rrnD. J. Mol. Biol. 168, 557-561.

48. Farnham, P. J. and Platt, T. (1980). A model for transcription termination suggested by studies on the trp attenuation in vitro using base analogs. Cell. 20, 739-748.

49. Farnham, P. J. and Platt, T. (1982). Effects of DNA base-analogs on transcription termination of the tryptophan operon attenuator of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 998-1002.

50. Finger, L. R. and Richardson, J. P. (1982). Stabilization of the hexameric form of Escherichia coli protein rho under ATP hydrolysis conditions. J. Mol. Biol. 156, 203-219.

51. Forbes, D. and Herskowitz, I. (1982). Polarity suppression dependent on the Q gene products of phage lambda. J. Mol. Biol. 160, 549-569.

52. Franklin, N. C. (1974). Altered reading of genetic signals fused to the N operon by bacteriophage lambda: Genetic evidence for modification of polymerase by the protein product of the N gene. J. Mol. Biol. 89, 33-48.

53. Friden, P., Newman, T. and Freundlich, M. (1982). Nucleotide sequence of the ilvB promoter-regulatory region: A biosynthetic operon controlled by attenuation and cyclic AMP. Proc . Natl. Acad. Sci. USA. 79, 6156-6160.

54. Friedman, D. I., Imperiale, M. J. and Adhya, S. (1987). RNA 3' end formation in the control of gene expression. Ann. Rev. Genet. 21, 453-488.

55. Fujimura, F. K. and Hayashi, M. (1978). Transcription of isomeric single-stranded DNA phages. in The single-stranded DNA phages. ed. Denhardt, D. T. et. al., p. 485. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York.

56. Fuller, R. S. and Platt, T. (1978). The attenuator of the tryptophan operon in E. coli: rho mediated release of RNA polymerase from a transcription termination complex in vitro. Nucl. Acids Res. 5, 4613-423.

57. Galloway, J. L. and Platt, T. (1986). Regulation of Gene Expression - 25 Years On, ed. Higgins, C. F. and Booth, I. R. New York; Cambridge Univ. Press. pp. 155-178.

58. Gardner, J. F. (1982). Initiation, pausing, and termination of transcription in the threonin operon regulatory region of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 257, 3896-3904.

59. Golinger, J. A., Yang, X., Guo, H. C. and Roberts, J. W. (1989). Early transcribed sequences affect termination efficiency of Escherichia coli RNA polymerase. J. Mol. Biol. 205, 331-341.

60. Gottesman, M. E., Adhya, S., Court, D. and Das, A. (1977). The role of rho in transcription termination in E. coli. FEBS 11th Meet. Gene Expression, ed. B. C. F. Clark, 43, 163-169. Oxford-New York: Pergammon.

61. Gottesman, M. E., Adhya, S. and Das, A. (1980). Transcription antitermination by lambda N gene product. J. Mol. Biol. 140, 57-75.

62. Grayhack, E. J. and Roberts, J. W. (1982). The phage lambda Q gene product: Activity of a transciption antitermination in vitro. Cell. 30, 637-648.

63. Grayhack, E. J., Yang, X., Lau, L. F. and Roberts, J. W. (1985). Phage lambda gene Q antiterminator recognizes RNA polymerase near the promoter and accelerates it through a pause. Cell. 42, 259-269.

64. Greenblatt, J. (1981). Regulation of transcription termination by the N gene protein of bacteriophage lambda. Cell. 24, 8-9.

65. Guarante, L. P., Mitchell, D. H. and Beckwitt, J. (1977). Transcription termination at the end of the tryptophane operon of E. coli. J. Mol. Biol 112, 423-436.

66. Guarneros, G. and Galindo, J. M. (1979). The regulation of integrative recombination by the b2 region and the cII gene of bacteriophage lambda. Virology. 95, 119-12.

67. Guarneros, G., Montanez, C., Hernandez, T. and Court, D. (1982). Posttranscriptional control of bacteriophage lambda int gene expression from a site distal to the gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79, 238-242.

68. Gupta, R. S., Kasai, T. and Schlessinger, D. (1977). Purification and some novel properties of RNase II. J. Biol. Chem. 252, 8945-8949.

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

70. Hayward, R. S. and Wright, J. J. (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.

71. Helling R. B., Goodman, H. M. and Boyer, H. W. (1974). Analysis of endonuclease R.EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. J. Virol. 14, 1235-1244.

72. Herskowitz, I. and Hagen, D. (1980). The lysis-lysogeny decision of phage lambda: Explicit programness and responsiveness. Ann. Rev. Genet. 14, 399-445.

73. Hirano, M., Shigeshada, K. and Imai, M. (1987). Construction and characterization of plasmid and lambda phage vector systems for study of transcriptional control in Escherichia coli. Gene. 57, 89-99.

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

75. Holben, W. E., Prasad, S. M. and Morgan, E. A. (1985). Antitermination by both the promoter and the leader regions of an Escherichia coli ribosomal RNA operon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 5073-5077.

76. Holmes, W. M., Platt, T. and Rosenberg, M. (1983). Termination of transcription in E. coli. Cell. 32, 1029-1032.

77. Honigman, A., Mahajna, J., Altuvia, S., Koby, S., Teff, D., Locker-Giladi, H., Hyman, H., Kronman, C. and Oppenheim, A. B. (1985). Plasmid vector designed for the analysis of transcription termination signals. Gene. 36, 131-141.

78. Horwitz, M. S. Z. and Lawrence, A. L. (1990). Structure-function relationship in Escherichia coli promoter DNA. Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol. 38, 137-164.

79. Howard, B. H., de Crombrugghe, B. and Rosenberg, M. (1976). Transcription in vitro of bacteriophage lambda 4S RNA: Studies on termination and rho protein. Nucl. Acids Res. 4, 827-842.

80. Howard, P. K., Shaw, J. and Otsuka, A. J. (1985). Nucleotide sequence of the birA gene encoding the biotin operon repressor and biotin holoenzyme synthetase function of E. coli. Gene. 35, 321-331.

81. Ishii, S., Kurogi, K., Sugino, Y. and Imamoto, F. (1980). Purification and characterization of the N gene product of bacteriophage lambda. Gene. 10, 291-300.

82. Jacob, F. and Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3, 318-356.

83. Jendrisak, J. et. al. (1987). in Guide to molecular cloning techniques, ed. Berger, S. and Kimmel, A., Academic Press, p. 359.

84. Kasai, T. (1974). Regulation of the expression of the histidine operon in Salmonella typhimurium. Nature. 279, 523-527.

85. Kassavetis, G. A. and Chamberlin, M. (1981). Pausing and termination of transcription within the early region of bacteriophage T7. J. Biol. Chem. 256, 2777-2786.

86. Keller, E. B. and Calvo, J. M. (1979). Alternative secondary structures of leader RNAs and the regulation of the trp, phe, his, thr, and leu operons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 6186-6190.

87. Kiss, A., Sain, B., Kiss, I., Boros, I., Udvardy, A. and Venetianer, P. (1978). Cloning of an E. coli ribosomal RNA gene and its promoter region from lambda rifd18. Gene. 4, 137-152.

88. Klenow, H., Overgaard-Hansen, K. and Patkar, C. (1971). Proteolytic cleveage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. Eur. J. Biochem. 22, 371-381.

89. Konings, R. N. H. and Schoenmaker, J. G. G. (1978). Transcription of the filamentous phage genome. in The single-stranded DNA phages. ed. Denhardt, D. T. et. al., p. 507. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York.

90. Korn, L. and Yanowsky, C. (1976). Polarity suppressors defective in transcription at the attenuator of the tryptophane operon of Escherichia coli have altered rho factor. J. Mol. Biol. 106, 231-241.

91. Küpper, H., Sekiya, T., Rosenberg, M., Egan, J. and Landy, A. (1978). A rho-dependent termination site in the gene coding for tyrosine tRNA su$_3$ of Escherichia coli. Nature. 272, 423-428.

92. LaFlamme, S. E., Kramer, F. R. and Mills, D. R. (1985). Comparison of pausing during transcription and replication. Nucl. Acids Res. 13, 8428-8440.

93. Landick, R., Carrey, J. and Yanowsky, C. (1987). Detection of transcription pausing in vitro in the trp operon leader region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 9561-9565.

94. Landick, R., Stewart, J. and Lee, D. N. (1990). Amino acid changes in conserved regions of the B-subunit of Escherichia coli RNA polymerase alter transcription pausing and termination. Genes Dev. 4, 1623-1636.

95. Lau, L. and Roberts, J. W. (1985). Rho-dependent transcription termination at lambda tR1 requires upstream sequences. J. Biol. Chem. 260, 574-584.

96. Lau, L. F., Roberts, J. W. and Wu, R. (1982). Transcription terminates at lambda tR1 in three clusters. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 79, 6171-6175.

97. Lau, L. F., Roberts, J. W. and Wu, R. (1983). RNA polymerase pausing and transcript release at the t_{R1} terminator in vitro. J. Biol. Chem. 258, 9391-9397.

98. Lau, L. F., Roberts, J. W., Wu, R., Georges, F. and Narang, S. A. (1984). A potential stem-loop structure and the sequence CAAUCAA in the transcript are insufficient to signal Rho-dependent transcription termination. Nucl. Acids Res. 12, 1287-1299.

99. Lazinski, D., Grzadzielska, E. and Das, A. (1989). Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginin-rich motif. Cell. 59, 207-218.

100. Lee, F. and Yanowsky, C. (1977). Transcription termination at the trp operon attenuator of Eschrichia coli and Salmonella typhimurium: RNA secondary structure and regulation of termination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 4365-4369.

101. Legerski, R. J., Hodnett, J. L. and Gray, H. B. Jr. (1978). Extracellular nucleases of Pseudomonas Bal31. III. Use of double-strand deoxyriboexonuclease activity as the basis of a convenient method to the mapping of fragments of DNA produced by cleveage with restiction enzymes. Nucl. Acids Res. 5, 1445-1465.

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

103. Liebke, H. and Hatfull, G. (1985). The sequence of the distal end of the E. coli ribosomal RNA rrnE operon indicates conserved features are shared by rrn operons. Nucl. Acids Res. 13, 5515-5525.

104. Lindahl, L., Archer, R. and Zengel, J. M. (1983). Transcription of the S10 ribosomal protein is regulated by an antiterminator in the leader. Cell. 33, 241-248.

105. Lowery, C. and Richardson, J. P. (1977). Characterization of the nucleoside triphosphate phosphohydrolase (ATPase) activity of RNA synthesis termination factor rho. J. Biol. Chem. 252, 1381-1385.

106. Lozeron, H. A., Dahlberg, J. E. and Szybalski, W. (1976). Processing of the major leftward mRNA of coliphage lambda. Virology. 71, 262-277.

107. Lynn, S. P., Bauer, C. E., Chapman, K. and Gardner, J. F. (1985). Identification and characterization of mutants affecting transcription termination at the threonin operon attenuator. J. Mol. Biol. 183, 529-541.

108. Maitra, U. and Barash, F. (1969). DNA dependent synthesis of RNA by Escherichia coli RNA polymerase: release and reinitiation of RNA chain from DNA template. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 64, 777-786.

109. Malo, M. S. and Loughlin, R. E. (1988). Promoter-detection vectors for Escherichia coli with multiple useful features. Gene. 64, 207-215.

110. Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratories, New York.

111. Maniatis, T., Jeffrey, A. and van de Sande, J. (1975). Chain length determination of small duble and single-stranded DNA molecules by polyacrylamid gel electrophoresis. Biochemistry. 14, 3787-3794.

112. Martin, F. and Tinoco, I. (1980). DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo (dA:rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. Nucl. Acids Res. 8, 2295-2300.

113. Maxam, A. and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labelled DNA with base specific chemical cleveages. Meth. Enzymol. 65, 449-560.

114. McKenney, K., Shimatake, H., Court, D., Schmeissner, U., Brady, C. and Rosenberg, M. (1981). A system to study promoter and terminator signals recognized by Escherichia coli RNA polymerase. in Gene amplification and analysis, Vol. II. Analysis of nucleic acids by enzymatic methods. (ed. Chirikjian, J. G. and Papas, T. S.). Elsevier-North Holland, Amsterdam.

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

116. Morgan, W. D., Bear, D. G., Litchman, B. L. and von Hippel, P. H. (1985). RNA sequence and secondary stucture requirements for rho-dependent transcription termination. Nucl. Acids Res. 13, 3739-3753.

117. Morgan, W. D., Bear, D. G. and von Hippel, P. H. (1983). Rho-dependent termination of transcription. I. Identification and characterization of termination sites for transcription from the bacteriophage lambda P_R promoter. J. Biol. Chem. 258, 9553-9564.

118. Morgan, W. D., Bear, D. G. and von Hippel, P. H. (1983). Rho-dependent termination of transcription. II. Kinetics of elongation during transcription from the bacteriophage lambda P_R promoter. J. Biol. Chem. 258, 9565-9574.

119. Neff, N. F. and Chamberlin, M. J. (1978). Termination of transcription by Escherichia coli RNA polymerase in vitro is affected by ribonucleoside triphosphate base analogs. J. Biol. Chem. 253, 2455-2460.

120. New England Biolabs Catalog 1990/1991.

121. Nichols, B. P., Blumenberg, M. and Yanowsky, C. (1981). Comparison of the nucleotide sequence of trpA and sequences immediately beyond the trp operon of Klebsiella aerogenes, Salmonella typhimurium, and Escherichia coli. Nucl. Acids Res. 9, 1743-1755.

122. Novack, R. L. and Doty, P. (1968). The resistance of ribonucleic acid polymerase to proteolytic attack during transcription in vitro. J. Biol. Chem. 243, 6068-6075.

123. Oppenheim, A. B., Gottesman, S. and Gottesman, M. (1982). Regulation of bacteriophage lambda int gene expression. J. Mol. Biol. 158, 327-346.

124. Orosz, A. (1984). Bakteriális transzkripciós terminátorok vizsgálata. Diplomadolgozat. József Attila Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Szeged.

125. Orosz, A., Boros, I. and Venetianer, P. (1990). Analysis of the complex transcription termination region of the Escherichia coli rrnB gene. Közlésre elküldve a J. Mol. Biol.-hoz.

126. Orosz, A., Boros, I. and Venetianer, P. (1988). Analysis of the complex transcription termination region of the rrnB gene of E. coli. 14th International Congress of Biochemistry. Prague. Abstract Book, p. 153. (poster).

127. Orosz, A., Boros, I. and Venetianer, P. (1990). Indirect evidences for lac promoter-terminator and translating ribosome-terminator interactions through RNA polymerase in artificial bacterial operons. EMBO Workshop "Proteins acting on DNA", Autrans, France. (poster.)

128. Orosz, A., Boros, I. and Venetianer, P. (1990). Molecular analysis of the complex transcription termination region of the E. coli ribosomal operon rrnB. 20th FEBS Meeting, Budapest, Hungary. Abstract Book, p. 85. (poster.)

129. Paebody, D. S., Andrews, C. L., Escudero, K. W., Devine, J. H., Baldwin. T. O. and Bear, D. G. (1989). A plasmid vector and quantitative techniques for the study of transcription termination in Escherichia coli using bacterial luciferase. Gene. 75, 289-296.

130. Pinkham, J. and Platt, T. (1983). Nucleotide sequence of the E. coli rho gene and its regulatory regions. Nucl. Acids Res. 11, 3531-3545.

131. Pirtle, R. M., Pirtle, I. L. and Inouye, M. (1980). Messenger ribonucleic acid of the lipoprotein of the Escherichia coli outer membrane. I. Nucleotide sequences at the 3' terminus and sequences of oligonucleotides derived from complete digest of the mRNA. J. Biol. Chem. 255, 199-209.

134. Platt, T. (1981). Termination of transcription and its regulation in the tryptophan operon of E. coli. Cell. 24, 10-23.

135. Platt, T. (1986). Transcription termination and the regulation of gene expression. Ann. Rev. Biochem. 55, 339-372.

136. Platt, T. and Bear, G. D. (1983). Role of RNA polymerase, rho-factor, and ribosomes in transcription termination. in Gene function in prokaryotes. ed. Beckwitt, J., Davis, J. and Gallant, J. A. pp. 123-161. New York, Cold Spring Harbor Laboratories.

137. Platt, T., Mott, J. E., Galloway, J. L. and Grant, R. A. (1985). Sequence specificity in transcription and translation. UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. (NS), Vol. 30, ed. Calendar, R. and Gold, L., pp. 151-160.

138. Pleij, C. W. A. (1990). Pseudonots: a new motif in the RNA game. Trends Biochem. Sci. 15, 143-147.

139. Pleij, C. W. A. and Bosch, L. (1989). RNA pseudonots: Structure, detection, and prediction. Meth. Enzymol. 180, 289-303.

140. Postle, K. and Good, R. F. (1985). A bidirectional Rho-independent transcription terminator between the E. coli tonA gene and an opposing gene. Cell. 41, 577-585.

141. Ratner, D. (1976). Evidence that mutations in the SuA polarity suppressing gene directly affect termination factor rho. Nature. 259, 151-

142. Richardson, J. P. (1982). Activation of rho protein ATPase requires simultaneous interaction at two kinds of nucleic acid binding sites. J. Biol. Chem. 257, 5760-5766.

143. Richardson J. P. and Carey, J. L. III. (1982). rho factor from polarity suppressor mutants with defects in their RNA interactions. J. Biol. Chem. 257, 577-5771.

144. Richardson, J. P., Grimley, C. and Lowery, C. (1975). Transcription termination factor rho activity is altered in Escherichia coli with suA gene mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 1725- 1728.

145. Richardson, J. P, Ruteshouser, E. C. and Chen, C.-Y. A. (1987). Identification of upstream sequence components of Rho-dependent transcription termination. in RNA polymerase and the regulation of transcription. ed. Reznikoff, W. S. et. al., NY, Elsevier, pp. 335-345.

146. Roberts, J. (1969). Termination factor for RNA synthesis. Nature. 224, 1168-1174.

147. Roberts, J. (1976). Transcription termination and its control in E. coli. In RNA polymerase. ed. Losick, R. and Chamberlin, M. p. 247. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York.

148. Roberts, J. W., Sloan, S. B., Weisberg, R. A., Gottesman, M. E., Robledo, R. and Harbrecht, D. (1987). The remarkable specificity of a new transcription termination factor suggests that the mechanisms of termination and antitermination are similar. Cell. 51, 483-492.

149. Roland, K. L., Liu, C. and Turnbourgh, Jr. C. L. (1988). Role of the ribosome in suppressing transcriptional termination at the pyrBI attenuator of Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7149-7153.

150. Rosenberg, M., Chepelinsky, A. B. and McKenney, K. (1983). Studying promoters and terminators by gene fusions. Science. 222, 734-739.

151. Rosenberg, M. and Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. Ann. Rev. Genet. 13, 319-353.

152. Roberts, T., Shimatake, H., Brady, C. and Rosenberg, M. (1978). Sequence of cro gene of bacteriophage lambda. Nature. 270, 274-275.

153. Rosenberg, M., Court, D., Wulff, D. L., Shimatake, H. and Brady, C. (1978). The relation between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in the phage lambda. Nature. 272, 414-423

154. Rosenberg, M. and Schmeissner, . (1982). Regulation of gene expression by transcription termination and RNA processing. in. Interactions of translational and transcriptional controls in the regulation of gene expression. ed. Grunberg-Manago, M. and Safer, B., p.l., Elsevier, New York.

155. Rosenberg, M. and Weissman, S. (1975). Termination of transcription in bacteriophage lambda. Heterogenous 3'-terminal oligoadenylate additions and the effect of Rho-factor. J. Biol. Chem. 250, 4755-4764.

156. Rosenthal, R. E. and Calvo, J. M. (1987). Effect of superhelicity on transcription termination. Mol. Gen. Genet. 207, 430-434.

157. Rossi, J., Egan, J., Hudson, L. and Landy, A. (1981). The tyrT locus: Termination and processing of a complex transcript. Cell. 26, 305-314.

158. Saedler, H., Besemer, J., Kemper, B., Rosenwirth, B. and Starlinger, P.(1972). Insertion mutations in the control region of the gal operon of E. coli. Mol. Gen. Genet. 115, 258-265.

159. Salström, J. S., Fiant, M. and Szybalski, W. (1979). N-independent leftward transcription in coliphage lambda: deletions, insertions and new promoters by-passing terminator functions. Mol. Gen. Genet. 168, 211-230.

160. Salström, J. S. and Szybalski, W. (1978). Coliphage lambda nutL: A unique class of mutants defective in the site of gene N product utilization for antitermination of leftward transcription. J. Mol. Biol. 124, 195-221.

161. Sarastle, M., Gay, N. J., Eberle, A., Runswick, M. J. and Walker, J. E. (1981). The atp operon: Nucleotide sequence of the genes for the gamma, beta, and epsilon subunits of Escherichia coli ATP sythetase. Nucl. Acids Res. 9, 5287-5296.

162. Sarmientos, P.; Sylvester, J.E., Contente, S. and Cashel, M. (1983). Differential stringent control of the tandem ribosomal RNA promoters from the rrnA operon expressed in vivo in multicopy plasmids. Cell. 32, 1337-1346.

163. Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M. and Court, D. (1984). Transcription termination involved in the expression of the int gene of phage lambda. Gene. 28, 343-350.

164. Schimmel, P. (1989). RNA pseudonots that interact with components of the translation apparatus. Cell. 58, 9-12.

165. Schindler, D. and Echols, H. (1981). Retroregulation of the int gene of bacteriophage lambda: Control of translation completion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 4475-4479.

166. Sekiya, T., Mori, M., Takahashi, N. and Nishimura, S. (1980). Sequence of the distal $tRNA_1^{Asp}$ gene and the transcription termination signal in the Escherichia coli ribosomal RNA operon rrnF (or G). Nucl. Acids Res. 8, 3809-3827.

167. Selliti, M. A., Pavsco, P. A. and Stelge, D. A. (1987). Lac-repressor blocks in vivo transcription of lac control region DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 3199-3203.

168. Seol, W. and Shatkin, A. J. (1990). Sequence of the distal end of E. coli ribosomal RNA rrnG operon. Nucl. Acids Res. 18, 3956.

169. Sharp, J. A. and Platt, T. (1984). Rho-dependent termination and concominant NTP-ase activity requires a specific intact RNA region. J. Biol. Chem. 259, 2268-2273.

170. Shigeshada, K. and Wu, C.-W. (1980). Studies of RNA release reaction catalized by E. coli transcription termination factor using isolated ternary transcription complexes. Nucl. Acids Res. 8, 3355-3369.

171. Shigeshada, K., Tsurushita, N., Matsumoto, Y. and Imai, M. (1984). Overproduction of transcription termination factor Rho in Escherichia coli. Gene. 29, 199-209.

172. Shimizu, N. and Hayashi, M. (1974). In vitro transcription of the tryptophane operon integrated into a transducing phage genom. J. Mol. Biol. 84, 315-335.

173. Siehnel, R. J. and Morgan, E. A. (1983). Efficient read-through of Tn9 and IS1 by RNA polymerase molecules that initiate at rRNA promoters. J. Bacteriol. 153, 672-684.

174. Smidt, M. and Chamberlin, M. J. (1984). Binding of rho factor to Escherichia coli RNA polymerase mediated by nusA protein. J. Biol. Chem. 259, 15000-15002.

175. Smidt, M. and Chamberlin, M. J. (1987). nusA protein of Escherichia coli is an efficient transcription terminator for certain termination sites. J. Mol. Biol. 195, 809-818.

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

177. Starzyk, R. M. (1988). A site-specific mRNA-cytoplasmic protein complex in vitro. Trends Biochem. Sci. 13,119-120.

178. Stewart, V. and Yanowsky, C. (1986). Role of the leader peptide synthesis in tryptophanase operon expression in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 167, 383-386.

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

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

181. Telesnitsky, A. P. W. and Chamberlin, M. J. (1989) Sequences linked to prokaryotic promoters can affect the efficiency of downstream termination sites. J. Mol. Biol. 205, 315-330.

182. Turnbough, C. L. Jr., Hicks, K. L. and Donahue, J. P. (1983). Attenuation control of pyrBI operon expression in Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 368, 372.

183. von Hippel, P. H., Bear, D. G., Morgan, W. D. and McSwiggen, J. A. (1984). Protein-nucleic acid interactions in transcription: A molecular analysis. Ann. Rev. Biochem. 53, 389-446.

184. Ward, D. F. and Gottesman, M. E. (1981). The nus mutations affect transcription termination in E. coli. Nature. 292, 212-215.

185. Wickens, M. P. and Dahlberg, J. E. (1987). RNA-protein interactions. Cell. 51, 339-342.

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

187. Winkler, M. E. and Yanowsky, C. (1981). Pausing of RNA polymerase during in vitro transcription of the tryptophan operon leader region. Biochemistry. 20, 3738-3744.

188. Wu, A. M., Chapman, A. B., Platt, T., Guarante, L. P. and Beckwitt, J. (1980). Deletions of distal sequence affect termination of transcription at the end of the tryptophan operon in Escherichia coli. Cell. 19, 829-836.

189. Wu, A. M., Christie, G. E. and Platt, T. (1981). Tandem termination sites at the end of the tryptophan operon in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 2913-2917

190. Yanowsky, C. (1981). Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature. 289, 523-527.

191. Yates, J. L. and Nomura, M. (1980). E. coli ribosomal protein L4 is a feedback regulatory protein. Cell. 21, 517-522.

192. Young, R. A. (1979). Transcription termination in the Escherichia coli ribosomal RNA operon rrnC. J. Biol. Chem. 254, 12725-12731.

193. Zuber, M., Patterson, T. A. and Court, D. (1987). Analysis of nutR: A site required for transcription antitermination in phage lambda. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 4514-4518.

194. Zurawski, G. and Yanowsky, C. (1980). Escherichia coli tryptophan operon leader mutations which relieve transcription termination are cis-dominant to trp leader mutations which increase transcription termination. J. Mol. Biol. 142, 123-129.