

Doktori értekezés

SV 40 enhancer szekvencia in vivo és in vitro vizsgálata
alacsonyabb rendű eukariota, élesztő sejtekben

Írta:

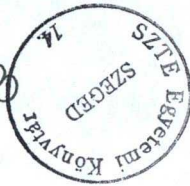
Várkonyi Zsuzsanna



SZEGED

1987

B 5143



E 2.885

TARTALOM JEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1
II.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
II.1.	Az eukariota génexpresszió	4
II.2.	A transzkripciót szabályozó speciális DNS szekvenciák	4
II.3.	A transzkripció szabályozásában résztvevő fehérje faktorok; hatásmechanizmus hipotézisek	7
II.4.	Az SV 40 majom tumorvírus korai gén promotere	10
III.	ANYAG ÉS MÓDSZER	16
III.1.1	Táptalajok baktériumhoz	16
III.1.2	Táptalajok élesztőhöz	17
III.2.	Kompetens sejt készítése és plazmid DNS transzformálása baktérium sejtbe	18
III.3.1	Plazmid izolálás	19
III.3.2	Gyors plazmid tisztítás	21
III.4.	Restrikciós endonukleázos emésztések	23
III.5.	Agaróz gélelektroforézis	24
III.6.	DNS fragment izolálás elektroelúcióval	24
III.7.	DNS fragment rejtett 3'-végének alfa P ³² -ATP-vel való jelölése	26
III.8.	Ligálás	26
III.9.	Élesztő transzformálás	27
III.10.1	HeLa nukleáris extraktum készítése	29
III.10.2	Nukleáris extraktum készítése élesztő sejtekből	30
III.11.	Poliakrilamid gélelektroforézis	32

III.11.1 Natív poliakrilamid gélelektroforézis, DNS-fehérje komplexek vizsgálatához	32
III.11.2 SDS-poliakrilamid gélelektroforézis fehérjék vizsgálatára	33
III.12. Ezüstfestés	34
III.13.1 Elektrolott nitrocellulóz filterre	35
III.13.2 DNS-fehérje kötés nitrocellulóz filteren	36
III.14. Béta-galaktozidáz enzim mérése élesztőben	36
IV. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	38
IV.1. Az SV 40 enhancer <u>in vivo</u> hatása <u>Saccharomyces cerevisiae</u> sejtekben	38
IV.1.1 A pSX178 plazmid transzformálása élesztőbe	38
IV.1.2 A béta-galaktozidáz enzim aktivitásának mérése	39
IV.2. Az SV 40 enhancer szekvenciához <u>in vitro</u> kötődő fehérje faktorok	43
IV.2.1 A DNS-fehérje komplexek vizsgálata poliakrilamid gélen	43
IV.2.2 Kompetíciós kísérletek	45
IV.2.3 DNS-kötő fehérjék nitrocellulóz filteren	49
V. ÖSSZEFOGLALÁS	52
VI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	54
VII. IRODALOM JEGYZÉK	55

I. BEVEZETÉS

1986-ban lehetőségem nyílt, hogy az UNESCO által támogatott International Training Course keretében az MTA SzBK Biokémiai Intézetében Dr Duda Ernő munkacsoportjában részt vegyek a kutatómunkában.

Vizsgálataink azokra a speciális DNS szekvenciákra irányultak, melyek az eukariota rendszerekben részt vesznek a génexpresszió szabályozásában. A génexpresszió regulációjának kutatása napjaink tudományos életének középpontjában áll, szinte naponta jelennek meg közlemények, melyek újabb és újabb adatokat szolgáltatnak a "mechanizmus" megértéséhez, de számos nyitott kérdés vár még válaszra, és hipotézis bizonyításra.

Hosszú ideig úgy tűnt, hogy a kromoszómális DNS vizsgálata magasabb rendű sejtekben igen nehézkes, viszont a DNS vírusok, melyek állati sejtekben szaporodnak, jó modellnek bizonyultak a génexpresszió tanulmányozására. Ezekkel a vírusokkal fertőzött normális sejtek tumoros sejtekké transzformálódhatnak, ami azt jelenti, hogy a vírusnak tartalmaznia kell olyan információkat, melyek képesek befolyásolni a magasabb rendű sejtek génexpresszióját.

A vírus okozta tumorok sejtjeinek kromoszómájába integrálódik a vírus DNS, replikációját és transzkripcióját a gazdasejt enzimrendszere végzi.

A vírusok szintén kódolnak regulátor fehérjéket, amelyek megváltoztatják a transzkripció specifitását.

Mivel az állati vírusok genetikája és molekuláris biológiája sokkal jobban ismert, azok reguláló DNS szekvenciájának kölcsönhatása a celluláris transzkripciós apparátussal választ adhat az eukariota génkifejeződés regulációjának kérdéseire.

Kísérleteinkben a majom simian vírus 40 (SV40) korai gén promotereinek regulátor szekvenciáit használtuk. A vírus jól nő sejtkulturában, kis cirkuláris DNS molekulát tartalmaz, amely 5243 bázispárból épül fel és kevesebb mint tíz fehérjét kódol.

Célunk egy modellrendszer létrehozása volt, melyben vizsgáljuk a reguláló DNS szekvencia in vivo hatását, illetve a szabályozás mechanizmusának in vitro kísérletes tanulmányozása.

A génexpresszió szabályozásának molekuláris mechanizmusában, az eddig ismert adatok szerint - nem történt lényegi változás az evolúció során.

Azok a rövid DNS szekvenciák, amelyek szerepet játszanak a génkifejeződés regulációjában megtalálhatóak az egyszerű és magasabb rendű eukariotákban egyaránt, sőt szekvenciahomológiát találtak a prokariota és eukariota szabályozó szekvenciák között is (Falkner és mtsai, 1986, Bodnar és Ward, 1987).

Feltételezhető, hogy a "legősibb" ezek közül a szekvenciák közül az, amely a transzkripció aktivitását szabályozza.

Ezért vizsgálatunk tárgyául az SV 40 vírus enhancerét választottuk, melynek hatását Saccharomyces cerevisiae, élesztő sejtekben vizsgáltuk. Szekvencia adatok bizonyították, hogy az állati sejtek enhancereinek "core" szekvenciájához (lásd később) hasonló DNS szakaszok előfordulnak az élesztő sejt genomjában is (Sassone-Corsi és Borrelli, 1986, Weiher, König és Gruss, 1983).

Az élesztő egyike a leghasznosabb eukariota organizmusoknak, amelyekben a génexpresszió szabályozását vizsgálhatjuk. Számos előnye közül csak néhányat említek itt meg.

Genomja kicsi, csak négyszer akkora mint az E.coli genomja. Gyorsan szaporodik - néhány óra alatt osztódik, kísérletileg éppen olyan könnyen kezelhető, mint a legtöbb prokariota sejt. Az élesztő genetikája jól ismert, kb. ezer mutánsa létezik, a különböző tápanyag autotrof mutánsoktól egészen a sugár érzékeny vonalakig. Ezek a mutációs törzsek igen jól használhatók molekuláris genetikai vizsgálatokra (többek között szelekciós markereket szolgáltatnak). A rekombináns DNS expressziója, - mellyel könnyen transzformálható az élesztő -, tanulmányozható a sejtben.

Szem előtt tartottuk, hogy azok az elemek, amelyek szerepet játszanak az enhancer hatás létrejöttének molekuláris mechanizmusában, sokkal könnyebben azonosíthatók, tisztíthatók, klónozhatók egy egyszerű eukariota genomjából, mint az állati sejtek összetett genomjából.



II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1 Az eukariota génexpresszió

Az eukariota sejtek három különböző RNS polimeráz enzimet tartalmaznak ellentétben a prokariota sejtekben található egyetlen RNS polimeráz enzimmel. A három enzimnek különböző a funkciója. A riboszómális RNS (rRNS) az rDNS génekről íródik át az RNS polimeráz I enzim segítségével.

A messenger RNS (mRNS) szintézisét az RNS polimeráz II katalizálja (az azonnal bekövetkező poli-A farok szintézisét a poli-A-szintetáz végzi).

A transzfer RNS-eket (tRNS) és a különböző kis molekulasúlyú magi és citoplazmás RNS-eket, melyek funkciója még nem teljesen tisztázott, az RNS polimeráz III készíti.

A három különböző RNS polimeráz létezése egyúttal azt is jelenti hogy három különböző típusú promoter van az eukariota rendszerekben, melyeknek regulációja egymástól független és különböző lehet.

A továbbiakban az RNS polimeráz II enzim által felismert promoterek általános szerkezetéről lesz szó.

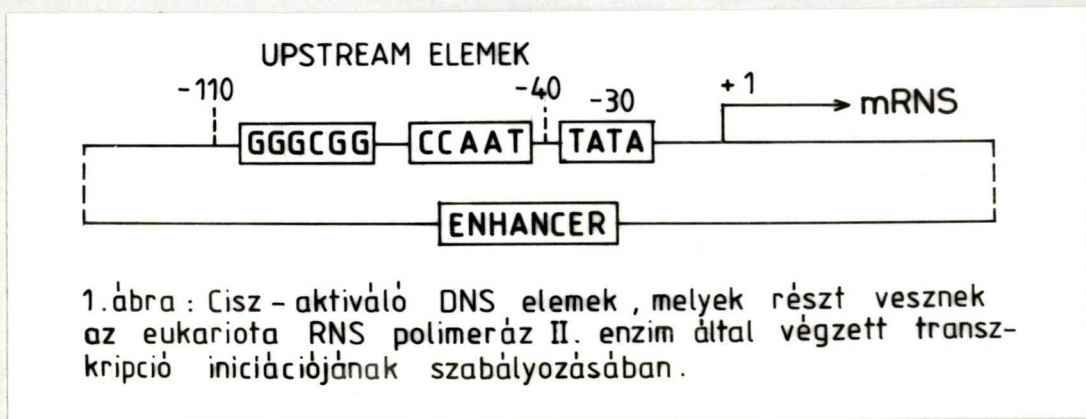
II.2 A transzkripciót szabályozó speciális DNS szekvenciák.

Az eukariota RNS polimeráz II enzim segítségével végbemenő transzkripciót úgynevezett "cis-acting" DNS szekvenciák (promoterek és enhancerek) szabályozzák, amelyek valószínűleg u.n. "trans-acting" fehérje faktorokkal való kölcsönhatásuk során fejtik ki hatásukat a transzkripcióra. A különböző "cis-acting" elemek amelyek a transzkripció iniciációját szabályozzák vázlatosan az 1. ábrán láthatók. A promoter régió tartalmazza a TATA-boxot mely általában 25-30 bázispárnyira található a mRNS start helyétől 5' irányban, és

egy vagy több "upstream" elemet amelyek körülbelül 20-70 bázispárral még arrébb helyezkednek el 5' irányban.

A TATA-box funkciója az, hogy az RNS-polimerázt a pontos transzkripció start helyre irányítsa.

Az "upstream" elemek az iniciáció gyakoriságának szabályozásban vesznek részt. A különböző promoterek "upstream" elemei között találtak szekvencia homológiát és konszenzus szekvenciákat - a két legáltalánosabb elem fel van tüntetve az 1. ábrán.



A legtöbb eukarióta fajban számos gén kifejeződését "enhancer" elemek is szabályozzák. Ezek a szekvenciák a "cis-acting" DNS elemek közé tartoznak, általában 100-200 bázispár hosszúságúak. Hatásuk orientációjuktól független és extrém nagy távolságból (még néhány kilóbázispárnyi távolságból) is megnyilvánul. Képesek a transzkripciót aktiválni akár homolog akár heterolog promoterekhez kapcsolódva. Legerősebb hatást általában a legközelebbi promoterre gyakorolnak.

Az enhancerek elhelyezkedhetnek akár 5', és néhány esetben 3' irányban is a transzkripció kiindulási pontjától, sőt, génen belül is. Szekvencia homológiát, mely minden enhancerre jellemző, ezideig nem találtak, de létezik egy konszenzus 9 bázispárnyi szakasz, a "core"-szekvencia/TGTGG^{AA}_{TT}AG/, mely megtalálható a legtöbb enhancerben, egy vagy két példányban.

Az enhancerek genetikai analizise rámutatott ezek meglehetősen összetett szerkezetére. Különböző funkcióval rendelkező rövid szekvenciákat, ismétlődéseket (boxok, elemek) találtak, melyek egymáshoz igen közel - gyakran egymást átfedve helyezkednek el. Általában hosszabb tandem ismétlődéseket is tartalmaznak, mely szekvenciák önmagukban is erősítik a transzkripciót, de együttesen igen erős enhancert hoznak létre.

Az enhancer szekvenciák szövet és differenciáció specifikusak is. Specificitásuk különböző fokú, például a polyoma vírus enhancer csak terminálisan differenciálódott sejtekben fejt ki hatást a béta-globulin gén promoterhez kapcsolva, míg embrionális carcinoma sejtekben nem. Ezzel ellentétben az SV 40 enhancer minden eddig vizsgált sejttípusban aktív, és így a szövet ill. sejtspecifikus enhancer aktivitás legszélesebb körű megnyilvánulásának képviselője (Sassone-Corsi, Duboule és Chambon, 1985).

Léteznek indukálható enhancerek is, melyek olyan DNS szekvenciák amelyek csak specifikus körülmények között - inducer jelenlétében, permisszív sejtekben - töltik be az enhancer szerepét. (Ezeket az inducereket tekinthetjük úgy, mint "trans-acting-co-factorokat", de kölcsönhatásuk mechanizmusa a transzkripciót reguláló protein faktorokkal még nem tisztázott) (De Franco és Yamamoto, 1986).

Az enhancerek és az "upstream" elemek szétválasztása nem egyértelmű, van példa mindkét csoportból olyan elemekre, melyek a másik csoportra jellemző tulajdonságokkal is rendelkeznek. Például az élesztőben, ahol csak egy csoportja létezik a reguláló elemeknek, az ugynevezett UAS (upstream activation sequences). Ezek a szekvenciák teljesítik azokat a feladatokat amelyeket az "upstream" elemek és az enhancerek, a többi eukariota sejtekben (Sassone-Corsi és Borrelli, 1986).

II.3 A transzkripció szabályozásában résztvevő fehérje faktorok; hatásmechanizmus hipotézisek.

Számos bizonyíték van arra, hogy fehérje faktorok is résztvesznek a transzkripció iniciációjának szabályozásában - vagy úgy, hogy közvetlenül a speciális DNS szekvenciával lépnek kölcsönhatásba, vagy mint általános "trans-acting" faktorok, melyek minden olyan gén expressziójához szükségesek, melyek átírásában az RNS polimeráz II enzim katalizál.

Ezek a fehérje faktorok sokféle szerepüknek megfelelően igen sokfélék lehetnek, mint például szövetspecifikusak, differenciáció specifikusak, indukálhatók stb.

Néhány "trans-acting" faktort tisztítottak és jellemeztek, de a hatásmechanizmusuk még nem teljesen ismert, valószínűleg kooperatív kötésekkel és más fehérje-fehérje interakciók során fejtik ki reguláló hatásukat.

Több hipotézis is született arra, hogy hogyan történhet a szabályozás azokban az esetekben amikor a specifikus DNS szekvenciák, amelyek befolyásolják a génexpressziót, a géntől több száz, vagy az enhancerek esetében akár több ezer bázispárnyi távolságban helyezkednek el. Ezek a regulátor fehérjék egy másik fehérjének (RNS polimeráz) aktivitását befolyásolják (Ptashne, 1986).

A hipotézisek a reguláló fehérjéket négy nagy csoportba sorolják. A "csavaró" fehérjék (twister), a "csúszó" fehérjék (slider), az "áthidaló" fehérjék (oozer) és a "hurok képző" fehérjék (looper).

Az egyik változata a DNS-csavaró proteinek modelljének, amikor a szabályozó fehérjék olyan DNS szakaszhoz kötődnek, melyek valamiben különböznek az általánostól - például bal menetűek vagy egyszálúak.

A másik variáció az, amikor maga a reguláló fehérjének van olyan enzimatis aktivitása, amely megváltoztatja a DNS konformációját, például kitekeri a hélixet, és a gén aktiválódása ennek a változásnak a következménye lenne - úgy, hogy a megváltozott DNS szerkezet alkalmas a további fehérjék kötésére és a transzkripció elkezdésére.

Az elmélet ellen sok adat szól. Az eddig tisztított és jellemzett DNS-kötő fehérjék mind az alfa-hélix konformációban lévő DNS-t ismerik fel. Néhány ezek közül a fehérjék közül az alfa-hélix nagy árkába illeszkedik be, és kötődésük során nem változtatják meg a DNS szerkezetét (Anderson, Ptashne és Harrison, 1985). Feltételezték, hogy az enhancer szekvenciák balmenetes DNS konformációban vannak jelen és a fehérjék a Z-DNS-t ismerik fel (Nordheim és Rich, 1983).

Több enhancerrel mutációs analízist végeztek, úgy alakítva a purin és pirimidin bázisokat, hogy az a legkedvezőbb legyen a Z-konformáció létrehozásához. A kísérletek eredményeiből kiderült, hogy az enhancer funkció betöltéséhez nem a Z-DNS jelenléte szükséges (Zenke és Mtsai, 1986). A következő kísérlet is a DNS-kötő fehérjék konformáció megváltoztató szerepe ellen szól (Plan és Wang, 1985). Létrehoztak egy olyan konstrukciót, melyben a reguláló szekvencia (SV 40 enhancer) egy hajtű kanyart hoz létre elkülönítve a cirkuláris DNS-től, mely a humán béta-globulin gént tartalmazza. Amikor ezt a konstrukciót bejutatták a sejtbe, a sejt génexpressziója enhancer függő volt, éppúgy, mint amikor az enhancert egy normális DNS tartalmazta. Ez bizonyította, hogy az enhancer "megcsavarása" nem lehet felelős a gén aktiválódásáért, mert az elkülönült enhancer csavarodása semmiféle hatással nem volt a gén konformációjára.

A következő hipotézis a speciális DNS szekvenciákon kötődő majd a DNS szálon a következő szekvenciáig elmozduló, elcsúszó fehérjék modellje (Yuan, 1981).

Az áthidaló fehérjék modellje azon alapul, hogy a szabályozó fehérje kötődik az operátorhoz és kötődik egy másik fehérjéhez is, mely képes egy következő fehérjével kölcsönhatásba lépni, és így tovább, egészen addig, míg ez a fehérjékből álló "híd" elér a kontroll szekvenciától a génig, ahol a transzkripció kiindulási pontja van. Ez az elképzelés csak abban az esetben állja meg a helyét, amikor a kontroll szekvencia közel található a transzkripció start helyéhez, de nyilvánvaló, hogy egy ilyen mechanizmus több ezer bázispárnyi távolságoknál nem jöhet számításba (Krasnow és mtsai, 1983).

A kísérleti tényekkel legjobban alátámasztott és legelfogadottabb elmélet a DNS "kihurkolódás" (looping), a DNS-hez kapcsolódó fehérje faktorok kötődése során. Az "upstream" operátorhelyhez kötődő fehérje kölcsönhatásba lép egy másik fehérjével, amely a transzkripció starthelyéhez közel kötődik, míg a közbeeső DNS hurkot formálva engedi a fehérjék kölcsönhatását. Az operátor és a gén közötti DNS szekvenciával deléciók ill. addíciók kísérleteket végezve azt a megfigyelést tették, hogy amikor egész számú hélix fordulatot távolítottak el ill. építettek be, akkor a génexpresszió szintje nem változott, azonban ha félfordulatokat - nagy mértékben csökkent (Takahashi, 1986).

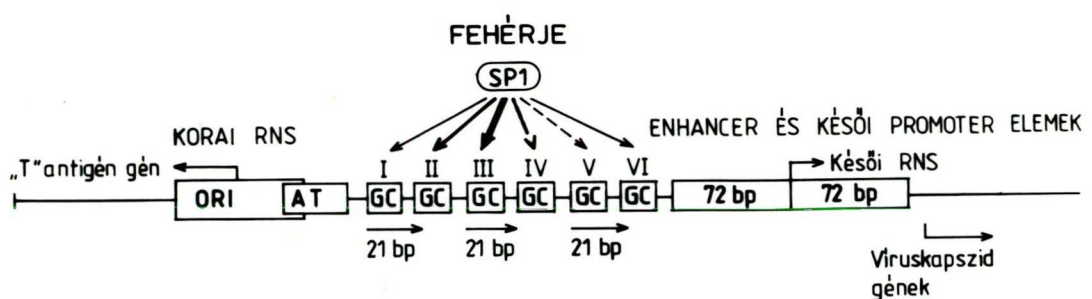
Ennek magyarázata lehet az a tény, hogy a fehérjék néhány száz bázispárnyi távolságból csak úgy képesek kölcsönhatásba lépni egymással - hurkot képezni - ha a DNS hélixnek ugyanazon oldalán foglalnak helyet. Félfordulatnyi DNS integrálásakor a fehérjék a hélix ellenkező oldalán foglalnak helyet és a kölcsönhatásukat a DNS megcsavarodásához szükséges energia igény lehetetelenné teszi.

II.4 Az SV 40 majom tumorvírus korai gén promotere

Az SV 40 korai génje a tumor antigént, T antigént, kódolja. A génextpressziója celluláris transzkripciós faktorok és vírus regulációs proteinek együttes szabályozása alatt áll. Először tekintsük át a regulációban résztvevő DNS szekvenciákat, a cis-reguláló szekvenciákat, majd azokat a transzkripciós faktorokat, amelyek szerepet játszanak a promoter RNS-polimeráz II-kötő szelektivitásában.

Számos kísérletet végeztek arra, hogy meghatározzák az SV 40 genom azon doménjeit melyek a vírus transzkripció szabályozásáért felelősek (Benoist és Chambon,1980; Everett, Baty és Chambon,1983).

Különösen kiterjedt vizsgálatok folytak az SV 40 korai promoter szakaszán, deléciók, inzerciók, bázis helyettesítéses és egyéb eljárások vezettek a végső eredményre, melyet vázlatosan a 2.ábra foglal össze (McKnight és Tjian,1986). A körülbelül 300 bázispárnyi szakasz - mely a korai és késői SV 40 transzkripciós egységek között foglal helyet - több különböző reguláló DNS szekvenciát tartalmaz.



2. ábra : SV 40 szabályozó régiója

A T antigén génjétől jobbra haladva az első szabályozó elem a DNS replikáció kiindulási helye (ORI) (Myers és Tjian,1980).

Ez a 70 bázispárnyi domén a replikációs origón kívül még több funkcióval is rendelkezik. Itt található három T antigén kötőhely (Shalloway, Klinberger és Livingston,1980), - (a T antigén kötődése represszálja a korai transzkripciót) - éppúgy, mint a korai promoter transzkripció iniciációs helye (Ghosh és Lebowitz,1981).

Közvetlenül a replikációs origóhoz csatlakozva egy AT-gazdag szekvencia részlet következik, mely hasonló az úgynevezett TATA-boxhoz, mely általánosan megtalálható azon eukariota gének előtt, melyek transzkripcióját az RNS-polimeráz II végzi (Goldberg,1979).

A TATA-szerű szekvenciát háromszor 21 bázispárból álló GC gazdag szekvencia követi. A 21 bázispárnyi ismétlődések mindegyike tartalmaz két hexanukleotidból /5'-GGGCGG-3'/ álló szakaszt.

A három 21 bázispárnyi ismétlődés deléciója minimálisra csökkenti a korai promoter funkcióját és a vírus életképességét (Fromm és Berg,1982). Azonban olyan vírus mutánsok, amelyekből a hat GC hexanukleotidból négy hiányzik, még mindig életképesek. Érdekes megjegyezni, hogy bár a 21 bázispárnyi ismétlődés felismerhető szimmetriával nem rendelkezik, képes funkcióját akár fordított helyzetben is betölteni (Gidoni és mtsai,1985).

Két további egymást követő ismétlődés (tandem repeat) helyezkedik el a késői gének felé haladva.

Ennek a két 72 bázispárnyi ismétlődésnek a teljes hiánya befolyásolja az életképességet és csökkenti a korai transzkripciót, de egy 72 bázispárnyi ismétlődés eltávolítása alapvetően nem befolyásolja a vírus szaporodását és a korai promoter funkciót.

Ez a 72 bázispárnyi elem szintén orientációjától függetlenül hat a korai transzkripcióra.

A 21 bázispárnyi ismétlődéssel ellentétben a 72 bázispárnyi elem képes aktiválni a transzkripciót még akkor is, ha több ezer bázispárnyi távolságban helyezkedik el, akár az 5', akár a 3' irányban a többi promóter elemtől (upstream vagy downstream).

Ez a kétszer 72 bázispárnyi szakasz volt az első olyan reguláló DNS szekvencia, mely a felsorolt meglepő tulajdonságokkal rendelkezett és a transzkripció mértékét számottevően megnövelte, erősítette - innen származik az enhancer elnevezés is (Moreau és mtsai,1981). Az enhancer 72 bázispárnyi régiója tartalmaz késői promoter elemeket is, de még nem tisztázott, hogy ezek a promoter elemek elkülönülve vannak-e jelen az enhancer aktivitásáért felelős szekvenciáktól (Rio és Tjian,1984).

AZ SV 40 korai promoter régióját felhasználva in vitro kísérletekben több DNS kötő fehérjét azonosítottak, melyek transzkripció faktoroként működnek.

Az egyik legkorábban leírt fehérje amely aktiválja az SV 40 korai promotert az Sp1, melyet HeLa sejtmagextraktumból izoláltak (Dyan és Tjian,1983).

Szekvencia specifikusan kötődik a DNS-hez, például az SV 40 korai promoterének GC-gazdag hexanukleotidjaihoz, melyek kétszer fordulnak elő mindhárom 21 bázispárnyi ismétlődésben. A hat potenciális Sp1 kötőhelyből sztérikus okok miatt csak öthöz kötődik, különböző affinitással a faktor (1.ábra). A DNS-hélix nagy árkában az öt Sp1 molekula a DNS azonos oldalán foglal helyet (Dyan és Tjian,1985). A legújabb közlemények alátámasztják a bevezetésben felvetett gondolatokat - miszerint a vírusok génexpresszió szabályozásának tanulmányozása során közelebb jutunk az eukariota génexpresszió regulációjának megértéséhez - ugyanis kiderült, hogy az Sp1 faktor szerepet játszik a celluláris gének promoterének aktiválásában is.



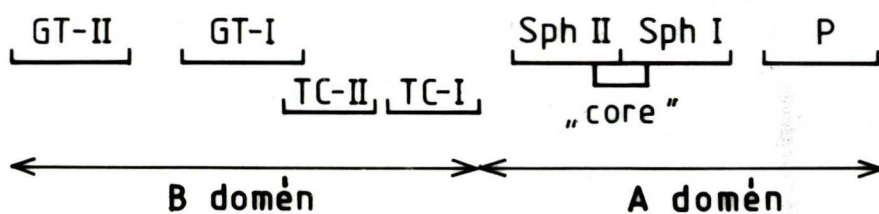
Összefoglalva, megállapíthatjuk hogy az SV 40 korai promoterének funkciója betöltéséhez tartalmaznia kell a:

- a, megfelelő "cis-acting" szabályozó elemeket
- b, ezeket a szabályozó elemeket celluláris transzkripciós faktorok szekvencia-specifikusan ismerik fel
- c, a faktorok kötődése az általuk felismert helyhez eredményezi a transzkripció pozitív kontrollját.

Virus szabályozó-fehérjék nem szükségesek a korai SV 40 transzkripció aktiválásához, de a korai mRNS maximális expressziója az enhancer jelenlététől függ.

Az SV 40 enhancer szekvenciájához specifikusan kötődő fehérjét ill fehérjéket találtak HeLa sejt nukleáris extraktjával végzett in vitro kísérletek során. A fehérjék azonosítása és kötődésük pontos helyének felderítése folyamatban van (Wildeman, Zenke és Schatz,1986).

A 72 bázispárnyi nukleotid szekvenciát, mely az enhancer aktivitásáért felelős, sorozatos pontmutációknak vetették alá (Zenke,1986). A kísérletek eredményeit összegezve megállapították, a 72 bázispárnyi repeat két fő, A és B, doménből épül fel, melyek önmagukban csak minimális enhancer aktivitást mutatnak (3.ábra).



3. ábra : Az SV40 enhancer szerkezete

Ezek a domének specifikus szekvencia szakaszokat tartalmaznak, melyek felelősek az ellátott funkcióért.

Az A domén az Sph-I és II-t és a P szakaszt, míg a B domén két GT-I és II, ill. TC-I és TC-II szakaszt foglal magába.

A két fő domén egymástól függetlenül képes a fehérjék megkötésére. Az A doménben létrehozott pontmutáció nem befolyásolta a B domén kötőképességét és viszont.

A két doménen belül szintén találtak egymástól független kötőhelyeket.

A szerzők szerint legkevesebb két fehérje faktor létezése valószínű, amelyek egymástól függetlenül kötődnek az SV 40 enhancer két fő doménjéhez, azok egymáshoz viszonyított orientációjától függetlenül. Ezek a fehérje faktorok az enhancer hatás létrehozásában feltehetőleg szerepet játszanak.

Annak felfedezése, hogy az SV 40 enhancer transzkripcionálisan fontos szerepet játszó elemei fehérjéket kötnek meg, számos kérdést vetett fel. Először is: hogy ezek a fehérjék különböznek-e egymástól? Ha figyelembe vesszük, hogy az úgynevezett GT és Sph szakaszok között semmiféle szekvencia homológia nem található, valószínűnek tűnik, hogy különböző fehérjék ismerik fel őket.

Azonban aktív enhancert nemcsak akkor kapunk, ha az A és B domén kapcsolódik össze, hanem abban az esetben is, ha két A vagy két B domént asszociálunk. Ez jelentheti azt, hogy az enhancer aktivitás különböző módokon jöhet létre - olyan fehérjék által melyek különböző funkciót látnak el, vagy olyan fehérjék segítségével, melyeknek funkciója azonos, de különböző szekvenciákhoz képesek kötődni.

Egy másik nyitott kérdés az enhancerek sejt specificitását érinti. Az SV 40 enhancer és az immunoglobulin nehéz lánc enhancer több közös elemet, hosszabb szekvencia homológiákat tartalmaznak, in vitro kísérletekben kompetálhatnak egymással. Ennek ellenére limfocita B sejtekben sokkal aktívabb az IG-HC-enhancer, mint bármely más sejtben, ahol az SV 40 enhancer aktív (Serfling, Jasin és Schaffner, 1985).

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

III.1.1. Táptalajok baktériumhoz

LB /Luria-Bertani/ táptalaj

Bacto Tripton 10 g pH:7,5 NaOH-val állítva

Bacto-yeast extract 5 g

NaCl 10 g

desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve

YTB táptalaj

Bacto Tripton 10 g pH kb 7,2 ,

Bacto-yeast extract 5 g nem kell állítani

NaCl 5 g

desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve

YTA táptalaj

Bacto Tripton 10 g

Bacto-yeast extract 5 g

NaCl 5 g

Bacto Agar 15 g

desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítve

Ezeket a táptalajokat 120^oC-on 30 percig sterilizáljuk. A hőérzékeny adalékanyagok /pl. antibiotikumok/ hozzáadása előtt legalább 55^oC-ra le kell hűteni a táptalajt.

Antibiotikumok

Ampicillin

100mg/ml-es törzsoldatot használunk, melyet szűréssel sterilizünk és -20^oC-on tároljuk. 50-100 µg/ml végkoncentrációban adjuk a táptalajhoz.

Tetracyclin

12,5 mg/ml-es törzsoldatot készítünk 50%-os etanolban. Szűréssel sterilizzuk, -20°C -on tároljuk. Lemezekhez 12,5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban használjuk.

III.1.2. Táptalajok élesztőhöz

YPDP komplett táptalaj

Bacto-yeast extract 10.0 g

Bacto Pepton 20.0 g

KH_2PO_4 1.5 g

Sterilizálás után a pH-t 7.0-re állítjuk, ezután

40% glükóz 40 ml

YNB minimál táptalaj (200 ml-hez)

20xYNB 10.0 ml

40% glükóz 10.0 ml

H_2O 180.0 ml

sterilen összemérni

YNBA szilárd táptalaj

20xYNB 10.0 ml

40% glükóz 10.0 ml

agaróz 4.0 g (2%)

desztillált vízzel 200 ml-re kiegészíteni, sterilen összemérni

20xYNB

Difco Yeast Nitrogen Base 13.4 g

H_2O 100.0 ml-re (végkoncentráció=0.67%)

sterilre szűrni

Adalékok

	törzsoldat 200 ml-ben	végkoncentráció
Uracil	480 mg	20 mg/l
L-triptofán	480 mg	20 mg/ml

III.2 Kompetens sejt készítése (-70°C-on tárolható) és plazmid DNS transzformálása baktérium sejtbe (Maniatis, 1981)

1. A megfelelő E. coli törzset leoltjuk 10 ml LB-be, 37°C-on rázatjuk egy éjszakán át.
2. Ebből a sejtszuszpenzióból 0,5 ml-t 200 ml LB-be beoltunk, és rázatjuk 37°C-on 3 óra hosszat.
3. A sejtszuszpenziót centrifugáljuk K23-as centrifugán, 4000 rpm-el, 10 percig, 0°C-on.
4. A sejteket felszuszpendáljuk 50 ml 0,1 M MgCl₂-ban 0°C-on.
5. Centrifugáljuk K23-as centrifugán, 4000 rpm-el, 10 percig, 0°C-on.
6. Szuszpendáljuk 50 ml 0,1 M CaCl₂-ban 0°C-on.
7. 20 percig 0°C-on áll.
8. Centrifugáljuk K23-as centrifugán, 4000 rpm-el, 10 percig, 0°C-on.
9. Szuszpendáljuk 3.3 ml 0.1 M CaCl₂+1,7 ml 28% glicerinben 0°C-on.
10. 200 µl-enként Eppendorf csövekbe töltjük 0°C-on.
11. Tárolás -70°C-on.
12. Transzformáláshoz jégen olvasztjuk fel.
13. A DNS-t (max. 0.5 µg) hozzáadjuk, rövid vortexezés.
14. 30 percig 0°C-on áll.
15. 2 percig inkubáljuk 42°C-on.
16. 10 percig 0°C-on áll.
17. 0,7 ml LB hozzáadása után enyhén rázatjuk 37°C-on 1 óra hosszat.
18. Szélesztjük YTA+antibiotikum lemezekre, a transzformáns telepek 12-16 óra múlva jelennek meg.

III.3.1. Plazmid izolálás (Maniatis, 1981)

Amplifikálás nélkül

1. 1l LB táptalajt (+antibiotikum) beoltva a O/N starterrel, 24 órán át növesztjük, 37⁰C-on állandó rázatás mellett. A sejteket centrifugáljuk 4000 g-vel 20 percig, 4⁰C-on.

A sejteket mossuk 200 ml pufferrel:

NaCl	0.1 M
Tris-HCl(pH=7.8)	10/0 mM
EDTA	1.0 mM

Lizis lúgos kezeléssel

2. A sejteket centrifugálás után 20 ml SOL-I. oldatban:

glukóz	50.0 mM
Tris-HCl (pH=8)	25.0 mM
EDTA	10.0 mM

felszuszpendáljuk, a szuszpenzió 5 mg/ml lizozimot tartalmaz (frissen készített!). 5 percig szobahőn inkubáljuk.

3. 40 ml frissen készített SOL-II. oldatot:

NaOH	0.2 N
SDS	1%

adunk hozzá. 10 percig jégen áll.

4. Ezután 30 ml jégben hűtött SOL III. oldatot:

5M K-Acetát	60.0 ml
jégecet	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

adunk hozzá. Újabb 10 perces jégen állás után 12000 rpm-mel 20 percig centrifugáljuk 4⁰C-on (JA 14).

5. A felülúszót kétfelé osztjuk. Csövenként 0.6 térfogat izopropanolt adunk az oldathoz. Összekeverjük és 15 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk.

6. A DNS-t 12000 g-vel 30 percig szobahőmérsékleten centrifugáljuk. A felülúszót elöntjük és a csapadékként kapott DNS-t 70%-os etanollal mossuk, ezt követően vákuumban szárítjuk.

7. A DNS-t 10 ml TE-pufferben vesszük fel.

TE:

TRIS 10.0 mM

EDTA 1.0 mM

Az oldathoz 50 μ l RN-ázt (cc. 10 mg/ml TE pufferben, 30 percig forralva, majd -20°C -on tárolható) adunk, 2-3 óráig 37°C -on inkubáljuk. A kezelést 50 μ l proteináz-K (cc. 10 mg/ml) hozzáadásával folytatjuk. Az inkubálást szobahőmérsékleten 1 óráig végezzük.

8. Azonos térfogatú fenol-kloroform eleggyel extrahálunk. A fázisok jobb elválása céljából az elegyet centrifugáljuk. A vízes fázist TE pufferrel (2-300 térfogat) szemben dializáljuk egy éjszakán keresztül 4°C -on.

9. Dialízis után a DNS-t 2 térfogat etanollal kicsapjuk. Egy-két órán keresztül állni hagyjuk szobahőmérsékleten, azt követően a DNS-t lecentrifugáljuk, majd a csapadékot vákuum alatt szárítjuk.

10. A kapott csapadékot 2 ml TE-pufferben vesszük fel és Sephacryl oszlopon (2.5x20cm) tisztítjuk.

Az eluáló puffer:

végkoncentráció

NaCl 250 mM

SDS 0.1%

2xTE (pH=8.0)-ben

11. 5ml-es frakciókat szedünk, melyekből 10 μ l-t 0.8%-os agaróz gélre viszünk fel a plazmid DNS tartalom ellenőrzése céljából. A DNS-t tartalmazó frakciókat egyesítjük.

12. 0.1 térfogat 3.0 M NaAc-ot és 2 térfogat EtOH-t adunk hozzá és egy éjszakán át -20°C -on állni hagyjuk.

13. JA 20 (Beckman) centrifugán 16000 rpm-el 20 percig fugáljuk. A csapadékot 70%-os hideg EtOH-val mossuk, majd vákuumban szárítjuk.

14. A DNS-t 1.5 ml TE-ben felvesszük és az alkoholos kicsapást megismételjük. Ezzel a módszerrel nagy tisztaságú plazmid DNS preparátumot kapunk, melyet TE pufferben -20°C -on tárolhatunk.

III.3.2. Gyors plazmid tisztítás

Restrikciós enzimes emésztésekhez, ligáláshoz, transzformációhoz, a transzformált telepek teszteléséhez, és amikor nincs szükség nagy mennyiségű, homogénre tisztított plazmidra, akkor használható ez a módszer.

1. Egy telepből leoltva felnövesztjük a sejteket 2-2 ml LB-táptalajban + megfelelő antibiotikum, 37°C -on, rázatva, 0/N.
2. Eppendorf centrifugán lecentrifugáljuk 2 percig, a felülúszót leöntjük.
3. A sejteket 100 μ l SOL I-ben felszuszpendáljuk
4. 10 μ l 50 mg/ml-es lizozim oldatot (SOL I-ben frissen oldott) adunk hozzá és 5 percig szobahőn inkubáljuk.
5. 200 μ l SOL II-t adunk hozzá, jól összekeverjük és 5 percig jégen tartjuk.
6. 150 μ l SOL III-t adunk hozzá, kevertetjük és 5 percig jégen tartjuk.
7. Eppendorf centrifugán 10 percig centrifugáljuk.



8. A felülúszót steril Eppendorf csőbe áttesszük, a térfogatát mérjük.
9. 1/2 térfogat DNS dializálóval (TE puffer) telített fenolt és 1/2 térfogat kloroformot adunk hozzá, összekeverjük majd egy percre centrifugáljuk.
10. A felső fázist mérve átpipettázzuk egy tiszta Eppendorf csőbe (kb 400 μ l) úgy, hogy a fenolos fázisból ne vigyünk át semmit.
11. 2 térfogat szobahőmérsékletű 96%-os alkohollal összekeverjük és két percre szobahőn inkubáljuk.
12. 15 percre centrifugáljuk.
13. A csapadékot 1-1 ml szobahőmérsékletű 70%-os alkohollal mossuk, majd exszikátorban szárítjuk.
14. A DNS-t 50 μ l TE pufferben feloldjuk + 1 μ l 1 mg/ml-es RN-ázt adunk hozzá. -20°C -on tároljuk. Egy restrikciós emésztéshez 15 μ l-t használunk.

III.4. Restriktációs endonukleázos emésztések (Biolabs New England alapján)

Emésztő pufferek az enzimekhez:

<u>"Low" puffer</u>	<u>"Medium"</u>	<u>"High"</u>
10 mM Tris/HCl pH=7.5	50 mM NaCl	100 mM NaCl
10 mM MgCl ₂	10 mM Tris/HCl pH=7.5	50 mM Tris/HCl pH=7
1 mM DTT	1 mM DTT	1 mM DTT
Bal I	Bam H I	EcoR I, II, V
Bgl II	Bgl I	Mbo I
Cla I	Hae III	Pvu I
Hae I, Hae II	Hha I	Sal I
Hpa I, Hpa II	Hinc II	Sph I
Hph I	Hind II, III	Xba I
Kpn I	Hinf I	Xho I
Mbo I	Pst I	Bst E I
Msp I	Pvu II	Dde I
Sac I, Sac II	Bsp R I	
Taq I	Ava I	
Xma I	Sau 3 A	
Acc I	Dra I	

Speciális puffer

6 mM Tris/HCl pH=8.0

6 mM MgCl₂

20 mM KCl

6 mM DTT

Sma I (inkubálás 25^oC-on)

A szükséges restriktációs endonukleázzal a megfelelő pufferben 37^oC-on inkubáljuk az emésztendő DNS-t. Az emésztést horizontális agaróz gélelektroforézissel ellenőrizzük.

III.5. Agaróz gélelektroforézis

Elektroforézis puffer DNS-hez: TBE (pH=8.3)

10x TBE puffer: 0.89 M Tris
0.89 M bórsav
0.02 M EDTA

5xmintafelvívő puffer: 20.0% glicerin
10.0 mM EDTA
0.25% brómfenolkék

A vizsgált DNS fragment nagysága (kilobázis)	Optimális agaróz gél koncentráció (%)
60-5	0.3
20-1	0.6
10-0.8	0.7
7-0.5	0.9
6-0.4	1.2
4-0.2	1.5
3-0.1	2.0

A gél 0.5 ug/ml koncentrációban etidium bromidot tartalmaz, a DNS fragmentek UV-fény alatt láthatóak. A futtatás 5 V/cm feszültség alatt történik.

III.6. DNS fragment izolálás elektroelúcióval (Maniatis, 1981)

1. A megfelelő koncentrációjú agaróz gélben futtatjuk a DNS-t. Az izolálni kívánt fragment helyét UV-fény alatt jelöljük meg
2. Éles szikével kivágjuk a fragmentet tartalmazó agaróz darabot.
3. A dializáló hüvelyt 0.5x TBE pufferrel tele töltjük, és a géldarabot a hüvelybe helyezzük.

4. A gél mellett csak annyi puffert hagyunk, amennyi az elektromos kontaktus biztosításához elegendő, és buborékmentesen kötjük be a hüvelyt.
5. A dializáló hüvelyt egy vékony réteg 0.5x TBE-be helyezzük az elektroforézis tankba.
6. 2-3 óra hosszat 100 V-al elektroeluáljuk a DNS-t a gélből a dialízis hártya belső falára.
7. A polaritást 2 percre megfordítjuk, hogy a hártya belső faláról eltávolítsuk a DNS-t, és Gilson pipettával óvatosan kiszedjük a gélt körülvevő puffert (a DNS jelenlétét UV lámpával ellenőrizhetjük).
8. A gélből visszanyert DNS-től a géltörmelékét szilikonozott üvegyapoton keresztül történő szűréssel választjuk el.
9. Extraháljuk egyszer azonos térfogatú fenollal, majd fenol-kloroformmal, végül kloroformmal.
10. A DNS-t két térfogat etanollal kicsapjuk, majd a csapadékot 200 μ l U.P. vízben oldjuk és 50 μ l 3 M nátrium-acetátot (pH=5.2) adunk hozzá.
11. Ismét kicsapjuk etanollal, a csapadékot 70%-os etanollal mossuk, majd megfelelő mennyiségű TE-ben oldjuk. -20°C -on tárolható.

III.7. DNS fragment rejtett 3'-végének alfa-³²P-ATP-vel való jelölése

(Maniatis, 1981)

A reakció elegy összetétele:

- 1 μ l 2mM dCTP
- 1 μ l 2mM dGTP
- 1 μ l 2mM dTTP
- 3 μ l 10x nick transzlációs puffer
- 3 μ l DNS (kb 500 ng)
- 12 μ l U.P. víz
- 2 μ l DNS-polimeráz Klenow fragment
- 50 μ Ci alfa-³²P-ATP beszárítva (spec. akt.=400Ci/mM)

20°C-on 30 percig inkubáljuk.

10x nick transzlációs puffer (-20°C-on tároljuk):

- 0.5 M Tris HCl (pH=7.2)
- 0.1 M MgSO₄
- 1.0 mM ditiotreitól
- 500 μ g/ml BSA

A jelölt DNS-t a be nem épült nukleotidoktól Sephadex G-50-es gélszűrővel választjuk el. 50 μ l-es alikvotokat gyűjtünk, az egyes frakciók radioaktivitását likvid szcintillációs számlálóval mérjük. (Az első radioaktív csúcs a DNS-be beépült radioaktivitás.) A jelölt DNS-t -20°C-on tároljuk.

III.8. Ligálás

- 10x ligáz puffer: 500 mM Tris/HCl ph=7.8
- 5 mM ATP
- 50 mM MgCl₂
- 100 mM béta-merkaptóetanol

A DNS fragmentumok ligálása (minimáltérfogatban) T4 ligáz enzimmel 11°C-on történik. Ellenőrzés agaróz gélelektroforézissel.

III.9. Élesztő transzformálás (Hinnen et al,1978, Beggs, 1978)

1. Négy transzformáláshoz 40 ml komplett táptalajban pl. YDPD-ben exponenciálisan szaporodó élesztő kultúrát ($2-8 \times 10^7$ sejt/ml $OD_{600-450}=0.6-1.0$) lecentrifugálunk (3000 g, 2 perc, Sorwall SS 34). A sejteket felszuszpendáljuk 10 ml SORB-EDTA pufferben.

<u>SORB-EDTA:</u>	10.0 ml-re
szorbitol(1.0M)	9.0 ml
EDTA (250 mM)	1.0 ml

Hozzáadunk 40 μ l 2-merkaptotetanolt és lassú keverés közben 30°C-on 20 percig inkubáljuk.

2. Centrifugáljuk (3000 g, 20 perc). A sejteket 10 ml SORB-EDTA-CITRÁT pufferben vesszük fel.

<u>SORB-EDTA-CITRÁT:</u>	10.0 ml-re
szorbitol (1.5 M)	6.7 ml
EDTA (250 mM)	0.4 ml
Na-citrát	2.5 ml
(0.4M pH=5.8)	
H ₂ O	0.4 ml

A szuszpenzióhoz frissen kimért Helicase-t adunk (30 mg, Peactifs, BF, Francia) és 30°C-on 60-100 percig lassú rázatás mellett inkubálunk. Ezalatt az idő alatt képződnek a szferoplasztok, melyek keletkezésére fénymikroszkóposan vagy desztillált vízben való szétesésük alapján következtethetünk. A szferoplasztok fizikai hatásokra érzékenyen reagálnak, könnyen kipukkadhatnak, éppen ezért csak nagyon óvatos, körültekintő kezelés mellett tarthatók fenn.

3. A szferoplasztokat centrifugáljuk (3000 g, 3x2 perc) és mossuk 3x10 ml 1 M-os szorbitollal. A harmadik mosás után 0.25 ml STC-ben szuszpendáljuk fel.

<u>STC:</u>	végkoncentráció
szorbitol	1.0 M
CaCl ₂	10.0 mM
TRIS-HCl(pH=7,5)	10.0 mM

4. 100-100 μ l élesztő szferoplaszt szuszpenziót szétosztunk Eppendorf csövekbe (annyi cső, ahány transzformáció) és 10-10 μ l DNS oldatot adunk hozzájuk (1-3 mg DNS). 10 μ l-nél nagyobb mennyiségű DNS oldat hozzáadása megváltoztathatja az ozmotikus körülményeket. Szobahőn inkubáljuk 15 percig, majd PEGTC puffert adunk a keverékhez,

<u>PEGTC:</u>	végkoncentráció
PEG ₄₀₀₀	22%
CaCl ₂	10.0 mM
TRIS-HCl(pH=7.5)	10.0 mM

óvatosan kevertetjük, szobahőn inkubáljuk egy percig, majd 20 másodpercig fugáljuk Eppendorf centrifugában. Ezt követően a kicentrifugált szferoplasztokhoz 300-300 μ l YDP+1.25 M szorbitol puffert adunk, az így kapott mintákat 30^oC-on 15 percig inkubáljuk

5. A mintákat 10 ml 45^oC-os regeneráló agarhoz adjuk.

<u>Regeneráló agar</u>	200 ml-re
szorbitol(1.0M)	40.0 g
agar (3%)	6.0 g

Desztillált vízzel 176 ml-re kiegészítve.

Autoklávozás után hozzáadunk:

20xYNB	10.0 ml
glükóz (40%)	10.0 ml
YPDP	4.0 ml



Vortexeljük és szelektáló táptalaj felületére öntjük (a regeneráló agart 60-65^oC-on felolvasztjuk majd 45^oC-os vízfürdőben lévő kémcsövekbe 10 ml-enként szétosztjuk. A szferoplasztok 45^oC-osnál melegebb regeneráló agarba nem kerülhetnek.

6. 3-5 napos inkubáció után (30-34^oC-on) jelennek meg a transzformánsok.

III.10.1 HeLa nukleáris extrakt készítése (Digman és mtsai, 1983, Wildeman és mtsai, 1984)

1. A sejteket a tápfolyadékból összegyűjtjük és K23 centrifugán 1000 rpm-el 10 percig centrifugáljuk.
2. Az üledéket 5 térfogat hideg PBS pufferben szuszpendáljuk és ismét centrifugáljuk (1000 rpm, 10 perc, K23).
3. 5 térfogat "A" pufferben 10 percig jégen áll:

"A" puffer: 10.0 mM HEPES (pH=7.9)

1.5 mM MgCl₂

10.0 mM KCl

0.5 mM DTT

0.5 mM PMSF

Centrifugáljuk 10 percig 1000 rpm-el (K23).

4. A sejteket 2 térfogat "A" pufferben szuszpendáljuk és Daunce homogenizátorral homogenizáljuk.
5. A homogenizátumot 10 percig 10000 g-vel centrifugáljuk. A felülúszót 25000 g-vel 30 percig centrifugáljuk.

6. A nukleáris csapadékot 3ml (10^9 sejt) "B" pufferben szuszpendáljuk.

"B" puffer: 20.0 mM HEPES (pH=7.9)

25.0% glicerin

0.42 M NaCl

1.5 mM $MgCl_2$

0.2 mM EDTA

0.5 mM DTT

7. $0^{\circ}C$ -on 30 percig enyhén kevergetjük, majd 20 percig 25000 g-vel centrifugáljuk.
8. A felülúszót 0.33g/ml $(NH_4)_2SO_4$ -al precipitáljuk, gyengén kevergetjük jégen.
9. 20 percig 25000 g-vel centrifugáljuk.
10. A csapadékot a felülúszó 1/2 térfogatának megfelelő "C" pufferban szuszpendáljuk.

"C" puffer: 20.0 mM HEPES (pH=7.9)

20.0 mM KCl

1.0 mM $MgCl_2$

2.0 mM DTT

12.0% glicerin

11. 10-12 órát $4^{\circ}C$ -on 100x térfogat kétszer cserélt "C" pufferrel szemben dializáljuk.
12. 150 μ l-es alikvotokban cseppfolyós N_2 -ben fagyasztjuk és $-70^{\circ}C$ -on tároljuk.

III.10.2. Nukleáris extrakt készítése élesztő sejtekből (Brom és Konberg, 1985)

1. A sejteket 1l YP+2% cukor táptalajon $OD_{600}=5$ -ig növesztjük.

2. Szferoplasztot készítünk (az élesztő transzformálásnál leírt módon).

3. A szferoplasztokat mossuk 10 ml "A" pufferben.

"A" puffer:

alap oldat 10.0 mM Tris-HCl (pH=8.0)

1.5 mM MgCl₂

15.0 mM KCl

0.1 mM EDTA

frissen hozzáadni: 0.5 mM DTT

1.0 mM PMST

1.0 mM trezolar

4. Lecentrifugáljuk 10 percig 3000 g-vel, majd a sejteket Dounce homogenizátorral (15x) feltárjuk, a sejtmagok így kinyerhetővé válnak.

5. A sejtmagokat 10 percig 10000 g-vel centrifugáljuk.

6. Az üledéket 10 térfogat (kb 50 ml) "B" pufferben szuszpendáljuk

B" puffer:

alap oldat 25.0 mM HEPES (pH=7.5)

5.0 mM MgCl₂

0.1 mM EDTA

10.0% glicerin

frissen hozzáadni: 0.5 mM DTT

1.0 mM PMSF

1.0 mM trezolar

50.0 mM KCl

7. 0.3 M végkoncentrációban (NH₄)₂SO₄-ot adunk hozzá, 4⁰C-on 30 percig keverjük.

8. A lizátumot centrifugáljuk 4⁰C-on (10 perc, 10000 rpm, SS-34-es rotorban).
9. A felülúszót összegyűjtjük és Beckmann Ti 60-as rotorban centrifugáljuk (50000 rpm, 4⁰C, 200 perc).
10. A felülúszót összegyűjtjük és kétszer dializáljuk 5 térfogat "B" pufferrel szemben (4⁰C, 3 óra).
11. 150 µl-es alikvotokban cseppfolyós N₂-ben fagyasztjuk és -70⁰C-on tároljuk.

III.11 Poliakrilamid gélelektroforézis /PAGE/

III.11.1. Natív poliakrilamid gél, DNS-fehérje komplexek vizsgálatához

Az akrilamid (AA) és a biszakrilamid (BA) aránya=29:1 a 40%-os törzsoldatban.

17x17 cm-es 1 mm vastag, 4%-os gél összetétele:

30 ml-hez: 3.0 ml 40%-os AA törzsoldat
 3.0 ml 10x "R" elektród puffer
 112.0 µl 10% ammóniumperszulfát (APS)/frissen!/
 37.5 µl N,N,N,N-tetrametiletilén diamin/TEMED/
 23.85 ml H₂O

10x"R"elektród puffer: 450.0 mM Tris-borát (pH=8.0)
 10.0 mM EDTA

A felvitt minta összetétele:

2000 cpm ³²P jelzett DNS fragment (2-3 µl)
10 ng fehérje tartalmú nukleáris extrakt (1-10 µl)
2 µl 10x "DNS-binding" puffer
1 µl (1 µg) "hordozó" DNS (pUC18/Alu)
steril desztillált vízzel 20 µl-re kiegészítve

10x "DNS-binding" puffer:

100.0 mM Tris HCl (pH=7.5)

500.0 mM NaCl

10.0 mM DTT

10.0 mM EDTA

50.0% glicerin

A gélt előfuttatjuk: 4^oC-on 200 V (40 mA) 100 percig

Futás : 4^oC-on 150 V (20 mA)

III.11.2. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis,fehérjék vizsgálatához

Törzsoldatok: 40% akrilamid törzsoldat /AA:BA=29:1/

1.0 M Tris-HCl (pH=8.8)

1.0 M Tris-HCl (pH=6.8)

10.0% SDS

10.0% APS /frissen!/
TEMED

10x "SDS" elektród puffer: 0.25 M Tris

1.92 M glicin

1.0% SDS

Mintafelvívő puffer: 0.06 M Tris-HCl (pH=6.8)

2.0% SDS

10.0% glicerin

0.05% brómfenolkék

5.0% béta-merkaptóetanol

Fehérje molekulatömege: 70-15 kD 30-70 kD 10-70 kD

Gélkoncentráció : 7.5% 10.0% 12.5%

1 mm-es 17x17 cm-es gélhez 25 ml elválasztó és kb 10 ml felvivő gél kell.

A gél összetétele: elválasztó gél: 12.5% felvivő gél: 5%

40% AA	7.8 ml	1.25 ml
1 M Tris-HCl	9.35 ml	1.25 ml
	(pH=8.8)	(pH=6.8)
H ₂ O	7.4 ml	7.29 ml
10% SDS	0.25 ml	0.1 ml
10% APS	170.0 µl	100.0 µl
TEMED	17.0 µl	10.0 µl

A fehérje mintákat felvitel előtt 2 percig forraljuk a mintafelvivő pufferben.

Futás: 20^oC-on, 30 V (140 mA)

III.12. Ezüst festés (Blum és mtsai, 1987)

Az SDS-poliakrilamid gélekben a fehérjék kimutatása ill. láthatóvá tétele a következő módszer segítségével történt:

1. Fixálás (1 óra)

Fixáló oldat: 50.0% metanol
12.0% ecetsav
1.85% formaldehid /0.5 ml 37%-os, literenként/

2. Mosás 3x20 percig 50%-os etanolban

3. Előkezelés 1 percig 0.8 mM Na₂S₂O₃ oldatban

4. Öblítés 3x20 másodpercig UP vízben (ultra tisztított)

5. Impregnálás: 0.2% AgNO₃

2.78% formaldehid /0.75 ml 37%-os, literenként/

6. Öblítés 2x20 másodperc UP vízzel

7. Előhívás: 6.0% Na_2CO_3
 1.85% formaldehid
 2.5mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Barna csapadék esetén erélyesen rázogassuk a gélt. Ha az oldat megbarnul, le kell cserélni frissre.

8. Mosás 2x2 perc UP vízzel

9. Leállítás (10 perc):

50.0% metanol

12.0% ecetsav

10. Mosás (20 perc): 50%-os metanolban

A gél 4°C -on eltartható vagy beszárítható.

III.13.1. Elektroblott nitrocellulóz filterre (Towbin, 1979)

SDS-poliakrilamid gélen elválasztott fehérjéket nitrocellulóz filterre vittük át (Western blotting).

A gél méretének megfelelő nitrocellulóz papírt és 4 db Watmann 3MM szűrőpapírt kivágunk, benedvesítjük a transzfer pufferrel, ráhelyezük a gélt a nitrocellulóz filterre és azzal együtt a blotting készülék műanyag lemezére rakjuk 2-2 Watmann 3MM papír között. Ügyelünk arra, hogy buborék ne maradjon a gél és a nitrocellulóz filter között, a két műanyag lemezt gumival rögzítjük, és úgy helyezzük a készülékbe, hogy a nitrocellulóz filter a pozitív pólus felé legyen.

20-27 V feszültséggel (100 mA) 4°C -on minimum 3 órát blottolunk.

A transzfer puffer összetétele: 3 g Tris
 14 g glicin
 200 ml metanol

Desztillált vízzel 1000 ml-re kiegészítjük.

Az LMW Pharmacia molekulásúlymarkert tartalmazó pályát a nitrocelullóz filterről levágjuk és Amidoblack 10 b-vel festjük meg.

III.13.2. DNS-fehérje kötés nitrocelullóz filteren

A nitrocelullóz filtert - melyre a nukleáris extrakt fehérjéit átblottoltuk - 10%-os BSA-val telítjük, 1 órán keresztül. Ezután 20 percig előinkubáljuk 2 ml "DNS-binding" pufferben, mely tartalmaz:

200 μ l 10x "DNS-binding" puffert

50 μ l "hordozó" DNS-t (pUC18/Alu)

Hozzáadunk kb. 10000 cpm mennyiségű radioaktív DNS próbát és 50 μ l nem izotóp jelzett SV 40 enhancer szekvenciát és 2 órán keresztül inkubáljuk, nylon tasakba hegesztve, enyhén rázatva úgy, hogy a folyadék réteg befedje a filtert.

Mossuk "DNS-binding" pufferben a filtert 2x30 percig. Megszárítjuk és autoradiogramot készítünk, ólomkazettában, erősítőernyővel -70°C -on kb 24 óráig exponáljuk (a beszárított retardációs gélekhez hasonlóan) FORTE röntgen filmre.

III.14. Béta-galaktoszidáz enzim mérése élesztőben (Guarente, 1983)

A sejteket minimál táptalajon növesztjük, 10^6 - 10^7 sejttségig. Lecentrifugáljuk és 1 ml "Z" pufferben felszuszpendáljuk.

"Z" puffer 100 ml-ben

16.1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

5.5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

0.75 g KCl

0.246 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

2.7 ml merkaptóetanol

A puffer pH-ját 7.0-ra állítjuk.

Pasteur pipettával három csepp CHCl_3 -t és 2 csepp 0.1% SDS-t adunk hozzá és 10 másodpercig erősen vortexeljük.

Az o-nitrofenil-béta-galaktozid (ONPG) hidrolízisét Miller szerint mérjük (1972).

0.2 ml 4 mg/ml ONPG-t adunk a 28°C -on előinkubált, feltárt élesztő sejtekhez. A reakció idejét stopper órával mérjük. Miután a sárga szín megjelenik (a béta-galaktozidáz enzim az ONPG-t galaktózra és sárga színű o-nitrofenolra hidrolizálja) a reakció 0.5 ml 1 M Na_2CO_3 -al állítható le. A sejtörmelékét centrifugálással eltávolítjuk. Az optikai denzitást (OD) 420 nm-nél mérjük.

Az enzim aktivitás meghatározható a következő képlet segítségével:

$$U=100 \times \frac{\text{OD}(420)}{t \times v \times \text{OD}(600)}$$

OD(600)= a sejt sűrűség a mérés előtt

t= reakcióidő percekben

v= az enzim mérésnél használt sejt kultúra térfogata ml-ben

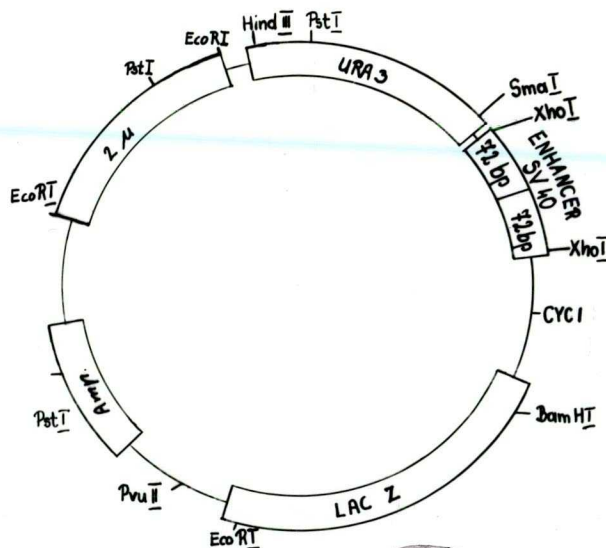
IV. KISÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

IV.1. Az SV 40 enhancer in vivo hatása *Saccharomyces cerevisiae* sejtben

IV.1.1. A pSX178E plazmid transzformálása élesztőbe

A pSX178 plazmid (Guarante és mtsai, 1982) molekulában a bakteriális béta-galaktozidáz enzim (EC.3.2.1.23.) génjének (lacZ) expressziója az izo-1-citokróom C (CYC1) élesztő gén promoter egy szakaszának (amely egy deléciót követően igen alacsony aktivitással rendelkezik) az irányítása alatt áll. A CYC1 gén az élesztő sejtekben a nukleáris DNS-en található meg és az RNS polimeráz II enzim segítségével íródik át.

A plazmid tartalmaz egy *E. coli* szelekciós markert (amp^R) és a bakteriális replikációs origót (ori) a pBR322 plazmidból, valamint egy *S. cerevisiae* szelekciós markert (URA3) és az élesztő replikációs origót a 2 μ -es plazmidból.



4. ábra: pSX178E, az élesztőbe transzformált plazmid



A pSX178 plazmid molekulába a CYC1 promoter előtt található Xho I helyre klónoztuk be az SV 40 enhancer 194 bázispárnyi fragmentjét, mely tartalmazza az enhancer aktivitásért felelős 2X72 bázispárnyi szekvenciát. Az így létrehozott pSX178E plazmid DNS-el (4.ábra) transzformáltuk a JF1 élesztő törzset, a III.9. pontban leírt módszer szerint. A JF1 trp^- , ura^- törzs, így a transzformánsokra ura^+ fenotípusuk alapján szelektálhattunk.

IV.1.2.A béta-galaktózidáz enzim aktivitásának mérése

A béta-galaktózidáz enzim szintjét élesztőben a III.14. pontban leírt módszer szerint határoztuk meg.

A *S. cerevisiae*nek nincsen endogén béta-galaktózidáz aktivitása, mely zavarná az általunk bevitt lacZ gén expressziójából származó enzimszint meghatározását.

Nem transzformált, pSX178 plazmiddal, és pSX178E plazmiddal transzformált élesztő kultúrákban az enzimaktivitást az $U=100 \times OD(420) / txvxOD(600)$ képlet segítségével határoztuk meg. (1. táblázat)

Méréseink során a reakcióidő; $t=60$ s, a sejtkultúra térfogata; $v=1$ ml volt.

Az egyes mérési eredmények függetlenül izolált kolóniák felszaporításából nyert tenyészetek enzimszintjeit jelentik.

1. táblázat

Béta-galaktozidáz enzimaktivitás mérések

Transzformáló DNS	OD(420)	OD(600)	U (Miller egység)
-	0.019	1.715	0.18
-	0.038	1.583	0.40
-	0.007	1.620	0.01
-	0.026	1.545	0.28
-	0.037	1.516	0.40
-	0.001	0.943	0.001
-	0.025	1.653	0.25
-	0.007	1.666	0.07
pSX178	0.055	1.420	0.65
"	0.060	1.592	0.63
"	0.054	1.662	0.54
"	0.063	1.651	0.64
"	0.055	1.489	0.62
"	0.055	1.673	0.56
"	0.068	1.560	0.73
"	0.050	1.589	0.52
"	0.077	1.582	0.81
"	0.060	1.385	0.72
"	0.041	1.297	0.52
"	0.031	0.878	0.59
"	0.006	0.245	0.41
"	0.012	0.798	0.25
"	0.013	1.035	0.20

<u>Transzformáló DNS</u>	<u>OD(420)</u>	<u>OD(600)</u>	<u>U (Miller egység)</u>
pSX178	0.079	1.683	0.78
"	0.084	1.542	0.91
"	0.080	1.516	0.88
"	0.015	0.380	0.66
"	0.021	1.106	0.31
<hr/>			
pSX178E	0.329	1.509	3.60
"	0.403	1.542	4.41
"	0.480	1.617	4.95
"	0.495	1.458	5.66
"	0.530	1.573	5.61
"	0.437	1.408	5.17
"	0.531	1.546	5.72
"	0.470	1.580	4.95
"	0.414	1.613	4.27
"	0.412	1.458	4.73
"	0.286	1.587	3.00
"	0.143	0.166	14.40
"	0.305	1.715	2.96
"	0.456	1.702	4.47
"	0.073	0.232	5.24
"	0.187	0.999	3.12
"	0.252	1.596	2.63
"	0.016	0.019	14.04
"	0.107	0.289	6.17
"	0.173	0.682	4.23

A pSX178 plazmival transzformált élesztő sejtekben a lacZ gén expressziója igen alacsony szintű.

Az enhancerek a génaktivitást akár százszorosára is megemelik, a géntermék nagymértékű felhalmozódása a sejtekben regresszív állapotváltozáshoz, majd sejthalálhoz vezethet. Ezért olyan rendszert kellett választanunk, amelyben a génexpresszióknak az alapszintje alacsony.

Az SV 40 enhancer szekvenciát hordozó plazmival (pSX178E) transzformált élesztő sejtekben az enzimszint 6-30 szorosára megemelkedett. Valószínű, hogy az enhancerhatás sokkal erősebb, mint amit mérni tudunk. Azoknak az izolált kolóniáknak a folyadék kultúráiban, amelyekben nagyon magas az enzim aktivitása, a sejtek növekedése igen lassú, és a legtöbb sejt végül elpusztul a nagymennyiségű fehérjetermelés következményeként. Az a tény, hogy az enhancer aktivitásért felelős DNS szakaszt tartalmazó plazmid DNS-sel transzformált sejtekben a teszt géneként használt bakteriális lacZ gén expressziója a fenti mértékben megemelkedett, alátámasztja azt a feltételezésünket, hogy létezik egy olyan molekuláris mechanizmus az élesztő sejtekben is, amely képes felismerni egy vírus enhancer szekvenciát, és képes a gének aktiválására felhasználni ezt a rendszert.

IV.2. Az SV 40 enhancer szekvenciához in vitro kötődő fehérje faktorok

IV.2.1. A DNS-fehérje komplexek vizsgálata poliakrilamid gélen

Feltételeztük, hogy az SV 40 enhancer szekvencia ("cis-acting" elem) fehérje faktorokon ("trans-acting" elemek) keresztül fejti ki génaktiváló hatását az élesztő sejtekben is. Ezért HeLa és élesztő sejtekből nukleáris fehérje extraktot készítettünk (III.10.1 és III.10.2. pontokban leírt módszerek szerint), hogy megvizsgáljuk, találunk-e olyan fehérje faktorokat, melyek specifikusan kötődnek az SV 40 enhancer szekvenciához.

Natív poliakrilamid gélelektroforézissel választottuk szét a DNS+fehérje komplexet a szabad DNS-től, vándorlási sebességük különbözősége alapján.

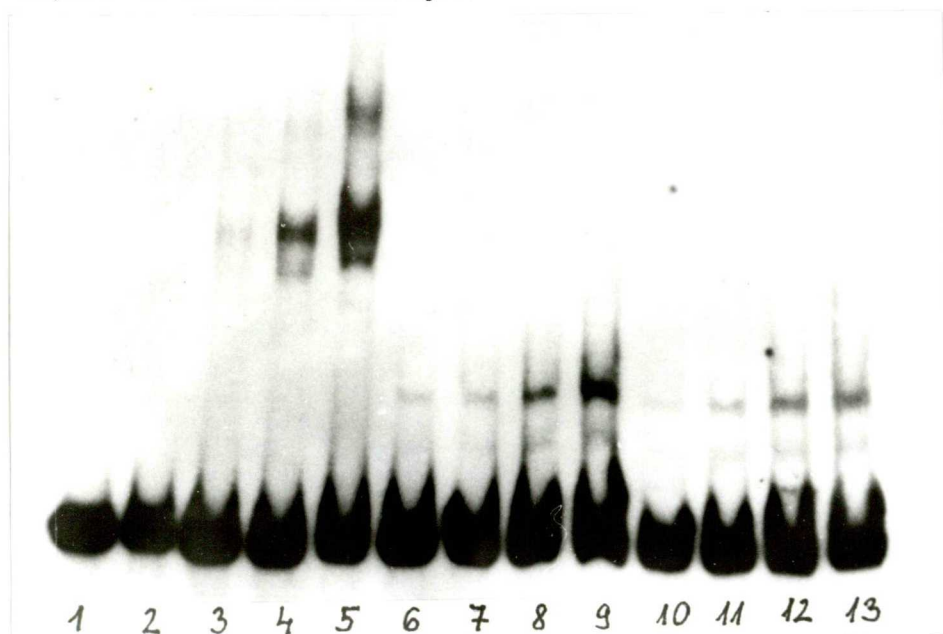
A 173 bázispár hosszúságú EcoRI - BamHI DNS fragmentet, mely az SV 40 enhancer aktivitásáért felelős 72 bázispárnyi szekvenciáját tartalmazta, rádioaktívan jelöltük.

A HeLa nukleáris extraktot kontrollként használtuk. Az élesztő nukleáris extrakttal megfelelő koncentrációban összekeverve a rádioaktív DNS próbát, az autoradiogrammon a DNS-hez erősen kötődő fehérje faktor vagy faktorok jelenlétére utaló mintázatot láthattunk (5.ábra),. (A DNS, fehérje megfelelő arányát minden új preparátumnál meg kellett állapítani.)

Azoknak a fehérjéknek a kötődését, amelyek nem specifikus kölcsönhatásban állnak a próbával, a reakció elegyhez adott jelöletlen DNS fragmentekkel (pl. Alu restrikciós enzimmel emésztett pUC18 plazmid DNS-sel) akadályoztuk meg.

A DNS-fehérje komplex létrejöttének optimális körül-ményeinek meghatározására végeztünk kísérleteket.

Ennek eredményeként megállapítottuk, hogy a kialakult komplex igen stabil; a hőmérséklet, idő, és ionerősség széles skálájú változtatása alig befolyásolta a DNS-fehérje komplex és szabad DNS arányt.



5. ábra. Retardációs gél autoradiogramja

1. Szabad SV-40 enhancer DNS (72 bp)

2-5. SV-40 enhancer DNS + HeLa nukleáris fehérje extrakt

2, 5, 10, 13 µl

6-9. SV-40 enhancer DNS + élesztő nukleáris fehérje extr.

2, 5, 10, 13 µl

10-13. SV-40 enhancer DNS + élesztő nukleáris fehérje extr.

egy másik preparátum 2, 5, 10, 13 µl

IV.2.2.Kompetíciós kísérletek

Minden fehérje, amely specifikus DNS szekvenciához kötődik, képes más DNS szekvenciához is kötődni, de kisebb affinitással. A nukleáris extraktumban jelenlevő nagy mennyiségű nem specifikusan kötődő fehérjék és a "hordozó" DNS szekvencia jelenléte miatt a kvantitatív adatokat a specifikus DNS-fehérje kölcsönhatás affinitására vonatkozóan csak megbecsülni tudtuk. A kölcsönhatás specifikusságának vizsgálatát jelöletlen specifikus fragmentek és nem specifikus DNS szekvenciák kompetíciójával végeztük.

A rádióaktívan jelzett DNS próbát, az élesztő nukleáris extraktot és a "hordozó" DNS-t (pUC18/Alu) tartalmazó reakció elegyhez fokozatosan növekvő mennyiségben nem jelzett SV 40 enhancer szekvenciát (1X72bp) tartalmazó DNS-t adtunk. A rádióaktív próbához viszonyítva 500-szoros moláris feleslegben adva volt képes a próbával kialakult komplexet megszüntetni.

Amikor a kísérletet olyan DNS fragmenttel végeztük, mely a 2X72 bázispárnyi szekvenciát tartalmazta, akkor 250-szeres feleslegnél létrejött a kompetíció. (6. ábra)



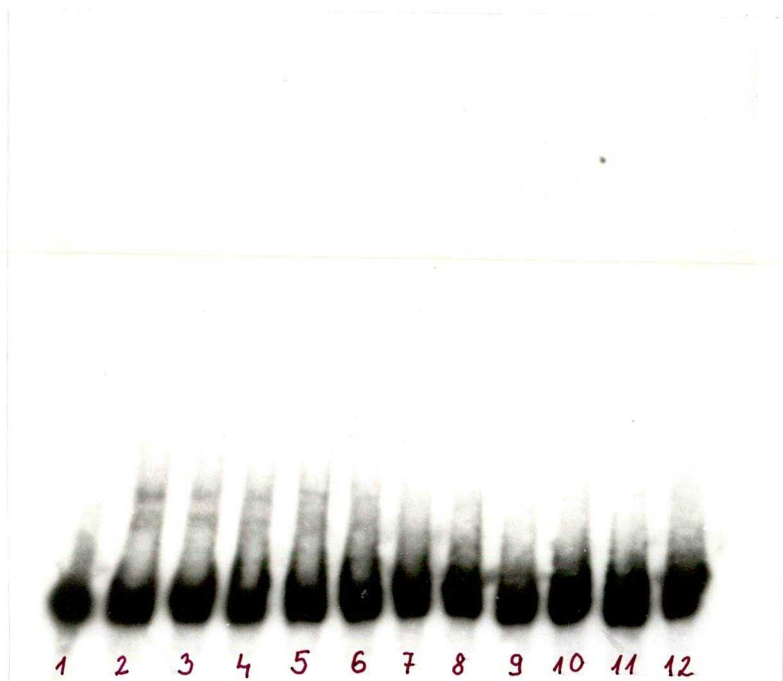
6. ábra. Kompetíció SV-40 enhancer DNS-sel.

1. Szabad SV-40 enhancer DNS (72 bp)
2. Kontroll (élesztő) (minta összetétel: 32. o)
- 3-8. Minta + 1, 10, 50, 100, 250, 500 ng 72 bp DNS
- 9-13 Minta + 1, 10, 50, 100, 250 2x72 bp DNS

Kompetíciós kísérleteket végeztünk különböző forrásból származó enhancer szekvenciákkal, a Rous szarkóma vírus és az immunoglobulin nehéz lánc enhancer DNS-el.

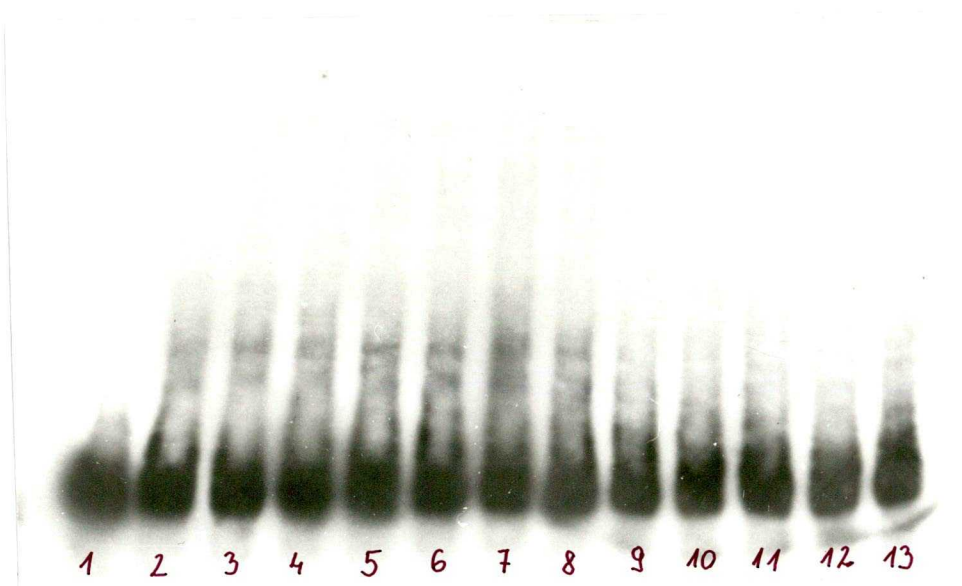
A Rous szarkóma vírus enhancer DNS 2-4-szer nagyobb mennyisége /mint az SV 40 enhancer DNS/ volt elegendő a komplex megszüntetéséhez. (7. ábra)

Az immunoglobulin nehéz lánc enhancer DNS esetében ez az arány még nagyobb, 4-8-szoros volt. (8. ábra)



7. ábra. Kompetíció RSV DNS-sel.

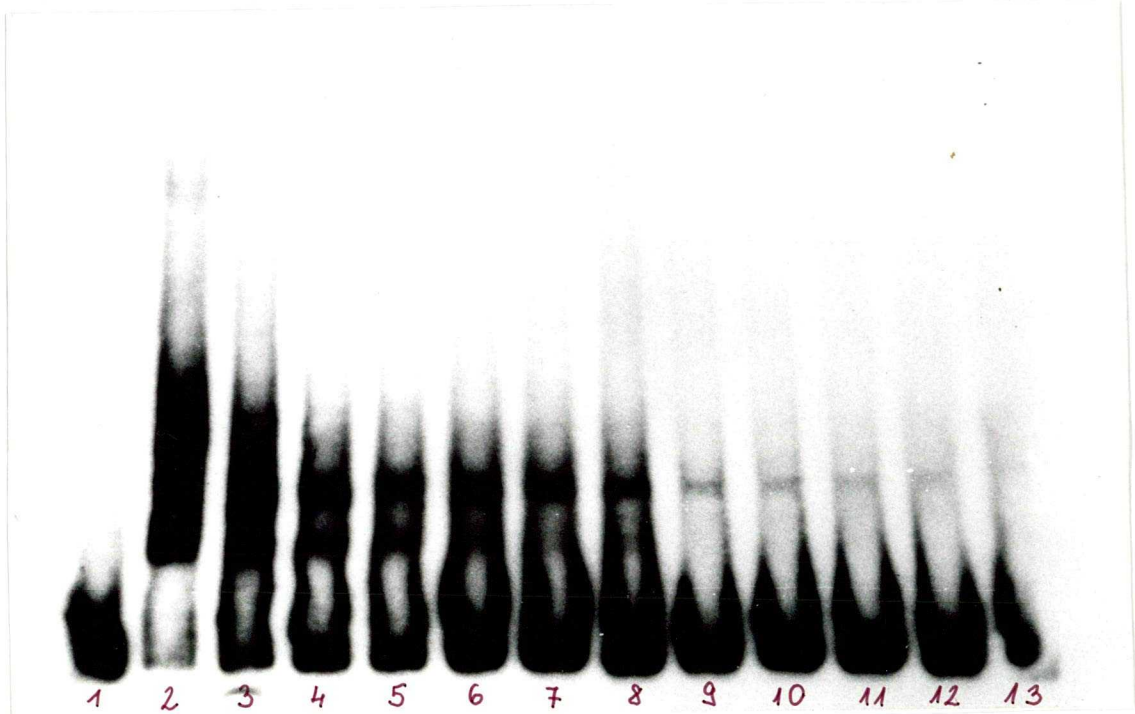
1. Szabad SV-40 DNS
2. Kontroll (élesztő) (minta összetétel: 32. o)
- 3-12 Minta + 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 ng RSV-DNS



8. ábra. Kompetíció IgE DNS-sel.

1. Szabad SV-40 DNS
2. Kontroll (élesztő) minta összetétel: 32. o
- 3-13 Minta + 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 ng RSV-DNS

Kontroll kísérletként a pUC18/Alu DNS-sel, mint nem specifikus DNS szekvenciával kompetáltattuk az SV 40 enhancer DNS-t, a kompetíció 8000-szeres feleslegnél jött létre. (9. ábra)



9. ábra. Kompetíció pUC 18/Alu DNS-sel.

1. Szabad SV-40 enhancer DNS

2-13. Minta + 1, 10, 100, 500, 1000, 2000, 3000,
4000, 5000, 6000, 7000 , 8000 ng
pUC18/Alu-DNS

A kompetíciós kísérletekből megállapítottuk, hogy a DNS-fehérje komplexben a kötés reverzibilis, megszüntethető.

Azt tapasztaltuk, hogy minél nagyobb volt az általunk vizsgált enhancer fragment szövet-specifitásának foka, annál nagyobb mennyiségű DNS volt szükséges a létrejött komplex megszüntetéséhez.

IV.2.3. DNS-kötő fehérjék nitrocellulóz filteren

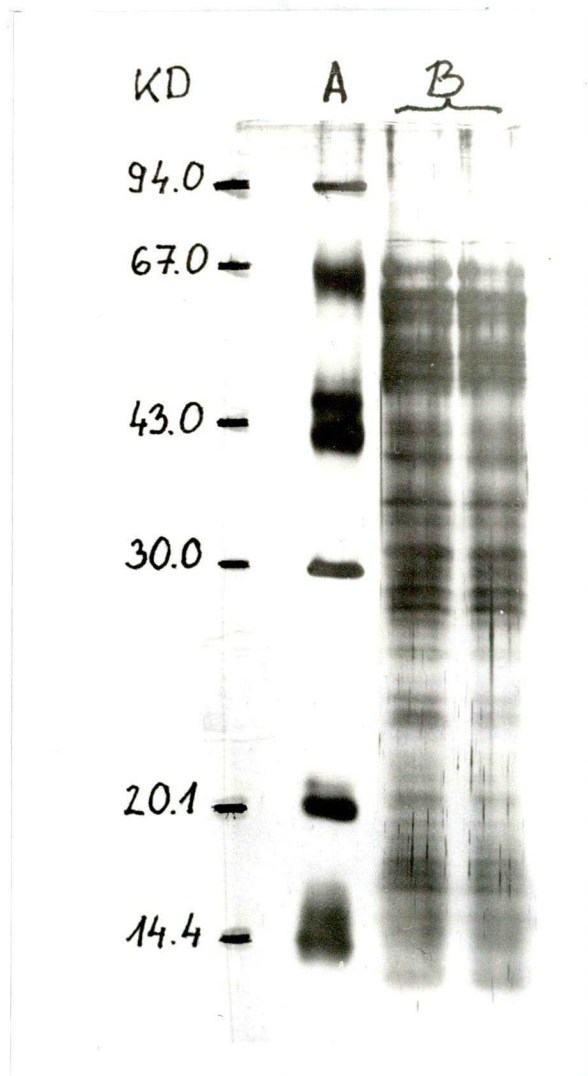
Az SV 40 enhancer szekvenciához specifikusan kötődő élesztő sejt magi fehérjék számának és molekulatömegének meghatározásához a nukleáris extraktot SDS-poliakrilamid gélen szétválasztottuk, majd nitrocellulóz filterre blottoltuk.

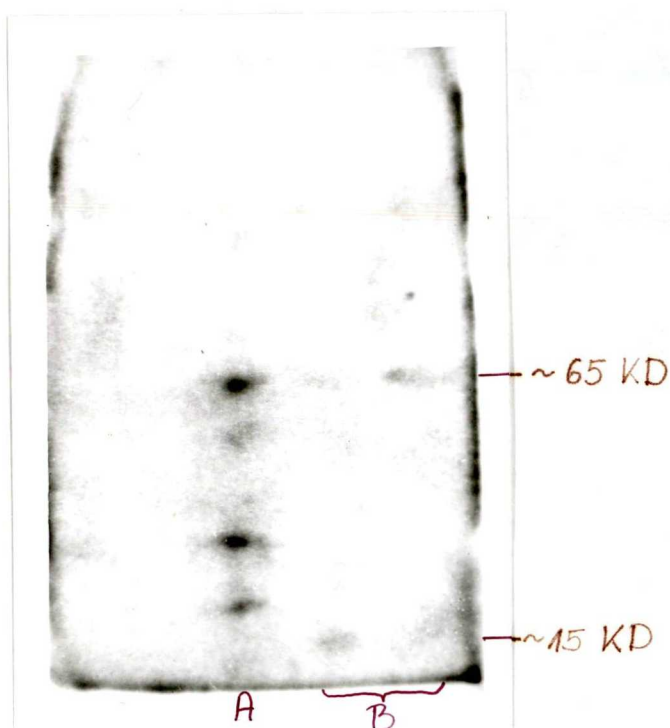
Az élesztő nukleáris extrakt fehérje összetétele az SDS-poliakrilamid gélen a 10.a. ábrán látható.

10.a. ábra. Az élesztő nukleáris extrakt fehérje összetétele SDS-poliakrilamid gélen.

A: Pharmacia LMW molekula
súly marker

B: Élesztő nukleáris extrakt





10b. ábra. Nitrocellulóz filter autoradiogramja

A: HeLa nukleáris extrakt

B: Élesztő nukleáris extrakt

A nitrocellulóz filteren renaturáltuk a fehérjéket (a III.13.2. fejezetben leírtak szerint), majd rádioaktiv és nem jelzett kontroll DNS-t adtunk hozzá. A 10.b. ábrán, a filter autoradiogramján látszik az öt csík a HeLa és kettő az élesztő nukleáris extraktból. A HeLa nukleáris extrakt egyik fehérjéje és a nagyobb élesztő fehérje közel azonos molekulatömegű, kb. 65-70 kD, míg a kisebb élesztő fehérje 15-20 kD.

Elképzelhető, hogy több fehérje is részt vesz a DNS-fehérje komplex kialakításában, amelyek esetleg ilyen kísérleti körülmények között nem képesek aktív konformációjukat, DNS-kötő képességüket visszanyerni, de megállapítható, hogy legalább két fehérje jelen van az élesztő nukleáris extraktban, melyek specifikusan kötődnek az SV 40 enhancer szekvenciához.

Feltételezzük, hogy az így kimutatott fehérje faktorok szerepet játszanak, mint transzkripciós faktorok vagy valamilyen strukturális funkcióval rendelkeznek, mint az aktív kromatin alkotói.

Ezek a fehérjék rendelkezhetnek enzimatis aktivitással - a közelmúlt felfedezései közé tartozik, hogy az RNS polimeráz II enzim legnagyobb alegysége egy erősen töltött domént tartalmaz karboxil terminális végén, amely megfelelő célpontul szolgálhat a foszforilálásnak - így nem elképzelhetetlen, hogy a fehérje faktorok funkciója in situ foszforilálása, vagy defoszforilálása ennek az RNS polimeráz doménnek, s ezáltal a transzkripció iniciáció valószínűségének a megnövelése.

A másik feltevés, hogy ezek a transzkripciós faktorok olyan doméneket tartalmaznak, amelyek olyan nukleáris proteineket kötnek meg, melyek nem rendelkeznek szekvencia specifikus affinitással a promoterhez.

Funkciójuk, szerepük eldöntésére további kísérletek szükségesek, de jelenlétük, és kölcsönhatásuk az enhancer szekvenciákkal elegendő bizonyíték arra, hogy a génexpresszió regulációjában az enhancer szekvenciák olyan általános szabályozó elemek, melyek egymástól távol eső fajokban, - mint például az alacsony rendű eukariota élesztő és az emlős szövetek - képesek hatásukat kifejteni.

V. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánkkal azt kívántuk bizonyítani, hogy a magasabb rendű szervezetekből származó enhancer szekvenciák képesek hatásukat alacsonyabb rendű eukariota rendszerben is kifejteni, élesztő sejtekben képesek a gének transzkripciós aktivitását megnövelni.

1. Létrehoztuk a pSX178E élesztő expressziós vektort, mely tartalmazta az SV 40 enhancer 2x72 bázispár hosszúságú szakaszát a teszt génként használt bakteriális lacZ gén előtt.

2. Ezzel a plazmid DNS-sel transzformáltuk a JF1 *Saccharomyces cerevisiae* törzset és mértük a béta-galaktoszidáz enzim szintjét, mely 6-30-szorosára emelkedett. Ezzel bizonyítottuk azt, hogy az élesztő sejtben jelen van egy molekuláris rendszer, mely felismeri és pozitív szabályozásra felhasználja az enhancer szekvenciát.

3. In vitro kísérleteinkben, retardációs géleken kimutattuk az SV 40 enhancer DNS szekvencia és ahhoz a specifikusan kapcsolódó fehérjék komplexeit élesztő nukleáris fehérje extraktumból.

4. Kompetíciós kísérletekkel megállapítottuk, hogy a fehérje-DNS kölcsönhatás reverzibilis, és vizsgáltuk a komplexekben a kötődés erősségét.

5. SDS gélelektroforézis után az élesztő nukleáris extraktumot átblottoltuk nitrocellulóz-filterre és a fehérjék renaturálása után ^{32}P jelzett SV 40 enhancer DNS-sel létrehoztuk a filteren a DNS-fehérje komplexet.

6. Megállapítottuk, hogy legalább két fehérje faktor vesz részt a komplex kialakításában, mely fehérjék molekula tömege 15-20, ill. 65-70 kD-nak adódott.

VI. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr Guba Ferenc professzor úrnak, a SZOTE Biokémiai Intézet vezetőjének, hogy biztosította szakmai továbbfejlődésemet és számomra minden segítséget megadott.

Köszönöm Dr Duda Ernőnek a lehetőséget, hogy kutatócsoportjának munkájába bekapcsolódhattam, türelmes, sokoldalú szakmai irányítását, hasznos tanácsait.

Gyuris Jenőnek szeretném megköszönni átadott tapasztalatait, valamint munkámhoz nyújtott segítségét.

Ezenkívül szeretném megköszönni mindazok segítségét, akik munkám elvégzéséhez hozzájárultak.

VII. IRODALOM JEGYZÉK

- Anderson, J., Ptashne, M. és Harrison, S. 1985 Nature 316; 596-601
- Beggs, J.D. 1978 Nature 275; 104-109
- Benoist, C. és Chambon, P. 1980 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77; 3865-3869
- Blum et.al. 1987 Electrophoresis in press
- Bodnar, J.W. és Ward, 1987 Nucleic Acids Res. 15; 1035-1041
- Brom, R. és Konberg, R. 1985 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82; 43-47
- De Franco, D. és Yamamoto, K.R. 1986 Mol.Cell.Biol. 6; 993-1001
- Dignam, J.D., Lebowitz, R.M. és Roder, R.G. 1983 Nucleic Acids Res. 11; 1475-1489
- Dynan, W.S. és Tjian, R. 1983 Cell 35; 79-87
- Dynan, W.S. és Tjian, R. 1985 Nature 316; 774-778
- Everett, R.D., Baty, D. és Chambon, P. 1983 Nucleic Acids res. 11; 2447-2464
- Falkner, F.G., Mocikat, R. és Zachau, H.G. 1986 Nucleic Acids Res. 14; 8819-8827
- Ghosh, P.K. és Lebowitz, P. 1981 J.Virol. 40; 224-240
- Gidoni, D., Kadohaga, J.T., Barrera-Soldana, H., Takahashi, K., Chambon, P. és Tjian, R. 1985 Science 230; 511-517
- Goldberg, M. 1979 Sequence and lysis of Drosophila histone genes. Ph.D. Thesis, Stanford University
- Guarente, L. 1983 Methods in Enzymology V: 101; 181-191
- Guarente, L.; Yocum, R. és Gilford, P. 1982 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79; 7410-7418

- Hinnen, A., Hicks, J. és Fink, G. 1978 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75; 1929-1933
- Krasnow, M.A., Matzuk, M.M., Dungan, J.M., Benjamin, H.W. és Cozzareli, N.R. 1983 in Mechanisms of DNA Replication and Recombination (ed. Cozzarelli, N.R.) Liss, New York 637-659
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Somerock, J. 1981 Molecular Cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- McKnight, S. és Tjian, R. 1986 Cell 46; 795-805
- Moreau, P., Hen, R., Wasylyk, B., Everett, R., Gaub, M.P. és Chambon, P. 1981 Nucleic Acids Res. 9; 6047-6067
- Myers, R.M. és Tjian, R. 1980 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77; 6491-6495
- Nordheim, A. és Rich, A. 1983 Nature 303; 674-679
- Plan, S. és Wang, J. 1986 Cell 45; 575-580
- Ptashne, M. 1986 Nature 322; 697-701
- Rio, D.C. és Tjian, R. 1984 J. Mol.Appl.Gen. 2; 143-150
- Sassone-Corsi, P., Duboule, D. és Chambon, P. 1985 Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 50; 747-752
- Sassone-Corsi, P. és Borelli, E. 1986 Trends Genet. 8; 215-219
- Serfling, E., Jasin, M. és Schaffner, W. 1985 Trends Genet. 1; 224-230
- Shalloway, D., Klinberger, T. és Livingston, D.M. 1980 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 75; 2170-2174
- Takahashi, K., Vigneron, N., Matthes, H., Wildeman, A. és Chambon, P. 1986 Nature 319; 121-126
- Towbin, H., Staehelin, T. és Gordon, J. 1979 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76;4350-4354
- Weiher, H., Konig, M. és Gruss, P. 1983 Science 219; 626-631

Wildeman, A.G., Zenke, M. és Schatz, C. 1986 Mol.Cell Biol. 6;
2098-2105

Wildeman, A.G., Sassone-Corsi, P., Grundström, T., Zenke, M. és
Chambon, P. 1984 EMBO J. 3; 3129-3133

Zenke, M, Grundström, T., Matthes, H. Wintzerith, M., Schatz, C.,

Wildeman, A. és Chambon, P. 1986 EMBO J. 5; 387-397

Yuan, R.A. 1981 Rev.biochem. 50; 285-315

