

A *Ceq* I restrikciós endonukleáz jellemzése

Doktori dolgozat

Készítette: Jobbágy Zsolt

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézete



Szeged, 1993.

B 5146



TARTALOMJEGYZÉK

Használt jelek és rövidítések

1.Bevezetés.....	1.
2.Irodalmi áttekintés.	3.
2.1. A restriktációs-modifikációs rendszerek.....	3.
2.2. A II-es típusú RM rendszerek.....	7.
2.2.1. Génlokalizáció.....	7.
2.2.2. Szabályozás.....	8.
2.2.3. A II-es típusú restriktációs és modifikációs enzimek alegységszerkezete..	10.
2.2.4. A II-es típusú restriktációs endonukleázok. kinetikája.....	11.
2.2.5. Az izoskizomerek	15.
2.2.6. A II-es típusú RM rendszerek klónozása...	16.
2.2.6.1. Szelekció a metiláz génre.....	17.
2.2.6.2. Szelekció az endonukleáz génre.....	18.
2.3. Az <i>EcoRI</i> RM rendszer.....	18.
2.3.1. Az <i>EcoRI</i> endonukleáz szerkezete és működése	19.
2.3.2. Szubsztrát felismerés.....	21.
2.3.2.1. Az első modell.....	21.
2.3.2.2. A módosított modell.....	21.
2.4. Az <i>EcoRV</i> restriktációs-modifikációs rendszer.....	23.
2.4.1. Az <i>EcoRV</i> RM rendszer szabályozása.....	23.
2.4.2. Szubsztrát felismerés.....	24.
3. Célkitűzés.....	30.

4. Anyagok és módszerek.....	32.
4.1. A <i>Corynebacterium equi</i> tenyésztése.....	32.
4.2. A <i>Corynebacterium equi</i> feltárása.....	32.
4.3. A CeqI részleges tisztítása.....	32.
4.4. Az enzimpreparátum tárolása.....	33.
4.5. Enzimaktivitás mérés.....	34.
4.6. A CeqI preparátum ultracentrifugálása....	34.
4.6.1. PC pufferben.....	34.
4.6.2. Szacharóz grádiensen.....	34.
4.7. A CeqI kicsapása és mosása szerves oldó- szerekkel.....	35.
4.8. A CeqI molekulatömeg szerint való elválasztása.....	35.
4.9. DNS preparálási módszerek.....	36.
4.10. A DNS radioaktív jelölése.....	37.
4.11. Kooperáció-vizsgálat a CeqI endonukleáz alegységei között.....	37.
4.11.1. Emésztési reakciók.....	37.
4.11.2. A kísérletek kiértékelése.....	38.
4.12. CeqI-DNS kötés vizsgálata "mobility shift" elektroforézissel.....	39.
4.12.1. Specifikus DNS próba előállítás a kötési kísérletekhez.....	38.
4.12.2. A kötés reakció.....	39.
4.12.3. Gél elektroforézis.....	40.
4.12.4. Autoradiográfia.....	40.
4.13. Kinetikai vizsgálatok.....	41.

4.14.	A CeqI restriktációs-modifikációs rendszer klónozása.....	42.
4.14.1.	Kromoszómális DNS készítése <i>C.equii</i> -ből..	42.
4.14.2.	Génbank készítés.....	43.
4.14.3.	<i>In vitro</i> pakolás.....	43.
4.14.4.	K-1400 jelű gazda fertőzése.....	44.
4.14.5.	Szelekció CeqI metilázra.....	44.
4.14.6.	Módszer a szokásosnál nagyobb plazmid transzformálására.....	44.
4.14.7.	Szelekció CeqI endonukleázra.....	45.
4.14.8.	A DNS szekvencia meghatározása láncterminalizációs módszerrel.....	46.
5.	Eredmények.....	49.
5.1.	A <i>Corynebacterium equii</i> tenyésztése.....	49.
5.2.	A <i>Corynebacterium equii</i> feltárása.....	50.
5.3.	A <i>Corynebacterium equii</i> fehérjepreparátum ultracentrifugálása.....	50.
5.4.	A CeqI endonukleáz reakció optimális körülményei.....	51.
5.5.	Molekulatömeg és molekuláris formák.....	52.
5.6.	Gél-retardációs kísérletek.....	56.
5.7.	Kinetikai vizsgálatok.....	59.
5.8.	A CeqI restriktációs-modifikációs rendszer klónozása <i>E. coli</i> -ban.....	62.
5.9.	A CeqI RM rendszer géneinek szekvenálása.....	68.
6.	Összefoglalás.....	70.

7. Irodalomjegyzék..... 72.

Függelék

Köszönetnyilvánítás

HASZNÁLT JELEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK

ATP	adenozin trifoszfát
CIP	borjúbél foszfataáz (Calf Intestine Phosphatase)
DNS	dezoxiribonukleinsav
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
EtBr	etidium-bromid
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
PAGE	poliakrilamid-gélelektroforézis
PEG	polietilén-glikol
RE	restrikciós endonukleáz(ok)
RM	restrikciós-modifikációs
rpm	fordulat per perc
SAM	S-adenozil-metionin
SDS	nátrium dodecil szulfát
TRD	célfelismerő domén
Tris	tris(hidroximetil)aminometán
U	nemzetközi enzimegység
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indoil- β -D-galaktozid
*	csillag (sztár) aktivitás

1. BEVEZETÉS

Korunk biokémiájának egyik legnagyobb hatású eseménye a restriktációs endonukleázok felfedezése volt.

A restriktációs-modifikációs (RM) rendszerek prokariótákban fordulnak elő. Eukariótákban csak virális genom által kódolt RM enzimeket írtak le (*Chlorella* vírusok esetén) (Van Etten és mtsai 1988). Az eddig megvizsgált több mint tízezer baktériumtörzs durván egy negyedében fedeztek fel valamilyen RM rendszert, ezeknek körülbelül fele többet is tartalmaz egyszerre. Általában kettőt vagy hármat, de előfordul hat, sőt hét különböző rendszer jelenléte egy adott baktériumban (Wilson, 1991).

A gazdabaktériumok palettája igen színes, a közönséges bélbaktériumtól (*E.coli*) (Meselson és mtsai 1968) a csendes-óceáni hőforrások közelében kagylókon élő *Hyphomonas jannaschiana*-ig (Danaher és mtsai 1990). A széleskörű előfordulás oka lehet, hogy a RM rendszerek szelekciós előnyt nyújtanak a gazdasejtnak. Hasonló jelenségről lehet szó, mint a drogrezisztencia esetén, ahol a rezisztenciát hordozó plazmid vagy transzpozon a gazdasejt túlélési esélyeit növelve saját terjedését segíti.

A restriktációs endonukleázok (RE) bevonulását a molekuláris biológia eszköztárába Hamilton O. Smith felfedezése tette lehetővé. Megfigyelte, hogy az általa tanulmányozott restriktációs endonukleáz (*HindII*) szekvenciaspecifikusan vágta a kétszálú DNS molekulákat, és

így lehetségessé vált homogén, pontosan meghatározott hosszúságú DNS fragmentek izolálása (Smith és Wilcox 1970).

Gyakorlati jelentőségükön felül a restrikciós endonukleázok fontos szerepet töltenek be mint a specifikus DNS-fehérje kölcsönhatások modellrendszerei.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A restriktációs-modifikációs rendszerek

A restriktáció-modifikáció jelenségét 1952-ben írták le először (Luria és mtsai 1952). Az alapmegfigyelés szerint az *Esherichia coli* K12 (K) törzsön növesztett lambda bakteriofágok egy újabb fertőzés során jól nőttek a K jelű törzsön, de csak a várható plakkszám kb. 1%-át eredményezték egy *E.coli* B törzs pázsitján. Ezen plakkokból származó fágok viszont már hatékonyan fertőzték a B törzs sejtjeit. A jelenség fordítva (B-ről K-ra) is fennállt. Valószínűnek látszott, hogy a fágok módosultak (modifikáció) valamilyen, az adott gazdatörzsre jellemző módon, míg más törzsben növekedésük gátolt volt (restriktáció).

Arber és munkatársai tisztázták a restriktáció és modifikáció biokémiai alapjait az 1960-as évek közepén (Arber 1965). Eszerint:

- a restriktáció a modifikálatlan DNS szekvenciaspecifikus endonukleolitikus lebontása

- a modifikáció a DNS metilációja a gazdasejtre jellemző mintázatban, mely által a DNS restriktációra rezisztenssé válik.

A rendszerek enzimei által felismert szekvenciák 4-8 bázispárosak, lehetnek folytonosak és megszakítottak, szimmetrikusak (palindrómok) és aszimmetrikusak, egyediek és degeneráltak. Általában kettős szálú DNS a szubsztrátjuk, de

ismertek egyszálú DNS szekvenciát felismerő enzimek is (pl. *DpnA* metiláz, *BspR*) (Cerritelli és mtsai 1989; Koncz és mtsai 1978).

Szerkezeti és működésbeli jegyek alapján a RM rendszereket három (Yuan 1981), később négy fő típusba sorolták (Petrusyste 1988).

Szerkezetileg legegyszerűbbek a **II-es típusú** rendszerek. Az ide sorolható ismert endonukleázok száma már több mint 2100, bár a sok izoskizomer miatt az egyedi specifitások száma kisebb, kétszáz feletti (Roberts és mtsai 1992). Az endonukleáz és metiláz aktivitások két különálló gén által kódolt fehérjemolekulához kötődnek. A metilázok átlagos mérete 400, az endonukleázoké 300 aminosav. A felismerőhely ugyanaz a palindrom szekvencia mindkét enzim számára, ez azonban nem jelent szerkezeti hasonlóságot (szekvencia homológiát) a kétféle fehérje között, sőt az *EcoRI* és *EcoRV* rendszer esetén kimutatták, hogy a felismerési mechanizmus is eltérő a nukleáznál és a metiláznál. A restrikciós reakció csupán magnézium ionokat igényel, a metilációhoz S-adenozil-metionin (SAM) szükséges.

A nagyfokú vágóhely-specifitás miatt főleg a II-es típusú endonukleázok használatosak a molekuláris biológiában.

A következő lépést a II-es típusú enzimek egy alosztálya (**II S típus**; shifted cleavage) képviseli. Az alosztályt alkotó jelenleg mintegy 80 endonukleáz közös jellemzője, hogy a 4-7 bázispáros aszimmetrikus felismerőhelytől 5-9

bázispárral távolabb történik a vágás. A molekulatömegük kb. kétszerese a II-es típusú endonukleázokénak, és monomer a működési egység. A felismerés és a vágás doménjei elkülönülnek (Szybalski és mtsai 1991; Li és mtsai 1992).

Bonyolultabb felépítésűek a **III-as típusba** sorolt RM rendszerek. A két működési egységből álló multifunkcionális proteinek vágni és metilálni is képesek a módosítatlan DNS-t. Modifikációs alegységüket két domén alkotja, a modifikációért és a szekvencia felismerésért felelős domének. A két alegység egyidejűleg működik. Azt, hogy a metiláció vagy a restrikció dominál-e a SAM koncentráció szabja meg. A SAM K_m értéke az endonukleáz reakcióban 40-szer kisebb mint a metiláz reakció esetén. Az enzim egy 5-6 bázispáros aszimmetrikus szekvenciát ismer fel és metilál, a vágás azonban 24-27 bázispárral távolabb történik. A metilálás csak az egyik szálát érinti. A vágás feltétele két ellentétes orientációjú metilálatlan felismerőhely megléte a DNS-en. ATP és Mg^{2+} a vágáshoz elengedhetetlen, a metilációnál azonban csak stimulatív szerepet játszik.

A **IV-es típusba** tartozó ezideig három RM rendszer (*Eco57I*, *GsuI*, *Bce83I*) bizonyos tulajdonságaiban a III-as típusú rendszerekhez hasonlít, azonban néhány markáns vonásuk indokolttá teszi a külön csoportba sorolást. Aktivitásukhoz Mg^{2+} ionokat igényelnek, ATP-t nem. A SAM a nukleázaktivitást fokozza. A hexanukleotid felismerőhelyen belül kettős szimmetriájú elemek találhatók. A vágás egyik szálon 14 a másikon 16 nukleotid távolságban történik a

felismerő helytől (Petrusyste és mtsai 1988; Matvienko és mtsai 1992)

Az *E.coli*-ban és rokonaiban (*Salmonella*, *Citrobacter*) írták le a kevesebb mint tucatnyi **I-es típusú** RM rendszert, amelyeket három családba soroltak (K, A és R124). Három gén által kódolt multifunkcionális enzimek. Külön gén létezik a speciális felismerő (S - specificity), a restrikciós (R) és a modifikációs (M) alegységek számára. Ez a három alegység alkotja az enzimet, mely mind metilációra, mind vágásra képes, azonban e két folyamat egyidejűleg nem mehet végbe. Az, hogy melyik aktivitás nyilvánul meg, a felismert DNS szekvencia metiláltságától függ. Ha mindkét szál metilált az enzim ledisszociál a DNS-ről. Ha egyik szál metilált a másikat is metilálja, ha azonban egyik szál sem metilált a DNS-t transzlokálja míg egy ugyanígy működő másik enzimrel érintkezésbe kerül, és megtörténik a vágás. A transzlokáció és a vágás ATP, Mg^{2+} és SAM igényes reakció, a metilációhoz csak SAM szükséges. A felismert szekvencia aszimmetrikus, 3 és 4 bázispárból álló specifikus szakasz elválasztva 6-8 aspecifikus bázispárral. A vágás random módon történik kb. két felismerőhely közt félúton (Studier és mtsai 1988). Az S alegységnek két cél felismerő doménje (TRD) van, egy-egy a felismerőhely 3 és 4 bázispáros részeire. A TRD-k egymástól függetlenül működnek, genetikai rekombinációjuk új specifitású enzimeket eredményezhet. Ez a modulrendszer lehet az oka annak, hogy ezek a nagyméretű, bonyolult enzimek evolúciósan sikeresek voltak (Wilson 1991).

2.2. A II-es típusú RM rendszerek

2.2.1. Génlokalizáció

A jelenleg ismert RM rendszerek túlnyomó része II-es típusú RM rendszer. A rendszerek génjei plazmidon (pl. *EcoRV*, *PvuII*) vagy kromoszómán (pl. *DpnI*, *DpnII*, *HpaI*) helyezkednek el. Olyan kromoszómán kódolt RM rendszereket is leírtak, amelyek génjeinek plazmidokon való előfordulása sem kizárható (pl. *PstI*, *HhaI*) (Wilson 1991).

Az endonukleáz és metiláz génjei általában együtt (mint a rendszer tagjai) fordulnak elő, és csak ritkán figyelhetők meg önálló enzimekként. Az önálló endonukleáz gén legalaposabban jellemzett példája a *DpnI*, melynek szubsztrátja metilált DNS (Lacks és Greenberg 1977). Az egyedülálló metiláz génre több példa is ismeretes (pl. *dam*, *dcm* metilázok), bár ezek funkciója más (metil-irányított mismatch repair, génexpresszió, DNS replikáció, "folt" repair) (Marinus 1987). Néhány bakteriofág szintén kódol metilázt, melynek segítségével elkerülheti a restrikciót (pl. *Bacillus* H2 fág) (Connaughton és mtsai 1990). A ϕ 3T, p11 és SPR bakteriofágok metilázai szokatlan multispecificitású enzimek (Balganesh és mtsai 1987; Behrens és mtsai 1987; Trautner és mtsai 1988).

Az endonukleáz és metiláz gének sorrendjét és irányát tekintve mind a négy lehetséges elhelyezkedés előfordul, ez

a konvergens evolúció lényeges szerepére utal a II-es típusú rendszerek létrejöttében.

2.2.2. Szabályozás

A II-es típusú RM rendszerek szabályozása részleteiben még nem tisztázott, bár a reguláció egyes elemeit már azonosították néhány rendszer esetében.

Elvi szabályozási lehetőség adódik az endonukleázok és a metilázok eltérő struktúrájából. A legtöbb endonukleáz homodimer, tehát az alegységeknek akkumulálódni kell az aktív enzim megjelenéséhez, míg a metilázok általában monomerként működnek, így aktivitásuk korábban jelenhet meg.

A *PstI* rendszer esetében az erősebb metiláz-promóter átfed és interferál a gyengébb és ellentétes orientációjú endonukleáz-promóterrel.

A *PvuII*, *BamHI*, *EcoRV* és *SmaI* rendszer génexpressziójának szabályozásáért egy *helix-turn-helix* motívummal bíró "trans-acting" proteint (*pvuIIC*, *bamhIC*, *ecoVC*, *smaIC*)) tartanak felelősnek (Tao és mtsai 1991, Nathan és Brooks 1988, Bougueleret és mtsai 1984, Heidman és mtsai 1989).

A *TaqI* helyek aszimmetrikus eloszlása (nulla a metiláz, hét az endonukleáz génben) gátolhatja meg az endonukleáz felszaporodását metiláz aktivitás hiányában (Slatko és mtsai 1987).

Az *EcoRV* gének transzlációs regulációja a mRNS másodlagos szerkezetén keresztül valósul meg (Bougueleret és mtsai 1984).

A kódoló régiók átfedését szintén a szabályozással hozzák összefüggésbe (RM *HincII*, RM *NgoPII*, RM *TaqI*, RM *TthB8I*). A *TaqI* és *TthB8I* rendszer esetén az átfedő régiók feltételezett szerepe "hajtű" szerkezet kialakítása, mely a transzkripció idő előtti terminációját okozza abban az esetben ha rövidebb (hibás) metiláz molekula képződne. Ez a mechanizmus védené meg az új gazdasejtet az endonukleáz letális hatásától (Barany és mtsai 1992).

Szabályozó hatású lehet a szubsztrát helyek sűrűsége illetve eloszlása a DNS molekulán belül, valamint koncentrációjuk. Az *EcoRII* enzim két felismerő hellyel (CCXGG, X=A vagy T) lép szimultán kapcsolatba az aktív komplexben. Az egyik hely alloszterikus aktivátorként működik, és nem vágódik el. Az aktiválás feltételei:

- a felismerő hely kötődjön az enzimhez (nem metilált, autentikus szekvencia),
- intermolekuláris kölcsönhatás esetén a stimulátor molekula kisméretű legyen (sztérikus gátlás elkerülése miatt),
- intramolekuláris kölcsönhatás esetén a két felismerőhely közti távolság ne legyen kb. 1000 bp-nál nagyobb. Az újabb adatok szerint a vágás produktumai reasszociálódva stimulátor molekulaként működhetnek (Pein és mtsai 1992).

2.2.3. A II-es típusú restrikciós és modifikációs enzimek alegységszerkezete

A metilázok általában monomer molekulák, jól elkülönülő felismerő és katalitikus doménnel, bár leírtak dimer alakban előfordulókat is (*DpnIIM*, *DpnIIA* metilázok; de la Campa és mtsai 1987).

Az endonukleázokra a homodimer szerkezet jellemző, bár ismerünk monomerként működő restrikciós endonukleázt is (pl. *BsuRI*, Kiss és mtsai 1985, *Sau96I*, Szilák és mtsai 1990). Az alegységek közötti kölcsönhatásnak fontos szerepe lehet az enzimműködésben, mint azt a később az *EcoRV* endonukleáz esetén látni fogjuk.

Néhány endonukleáz esetén kisebb nagyobb aggregációs hajlamot találtak *in vitro*, főleg a fiziológiához közelálló, alacsony sókoncentráció esetén. A *BamHI*, *EcoRI*, *Bst1503* (Smith és mtsai 1979; Polisky és mtsai 1975; Catteral és mtsai 1979) endonukleázok szedimentációs vizsgálata dimer és tetramer formák egyidejű jelenlétét mutatta ki. A disszociációs konstans alapján a tetramer forma dominanciáját (80%) feltételezték *in vivo* az *EcoRI* endonukleáznál, bár az aktivitást a dimer szerkezethez köthették (Modrich és mtsai 1976). A *BglI* endonukleáz 20 azonos, biológiailag aktív monomerből felépülő pentagonális dodecahedronná aggregálódhat, melynek molekulásúlya eléri az 1200 kDa-t (Johannssen és mtsai 1979).

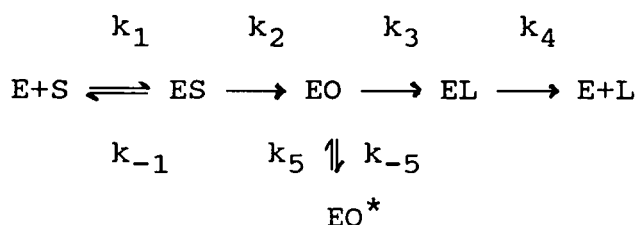


2.2.4. A II-es típusú restrikciós endonukleázok kinetikája

Az eddig felfedezett II-es típusú restrikciós endonukleázok nagy számához képest enzimkinetikai adatok csak elenyésző hányadukról állnak rendelkezésre.

Az endonukleázok a kifejezett szekvenciaspecifitáson kívül abban is különböznek a többi enzimtől, hogy szubsztrátjuk topológiája jelentősen befolyásolja kinetikai folyamataikat és viszonylag lassú a "turnover"-ük. Az enzimek döntő többsége 100 s^{-1} körüli k_{cat} értékkel rendelkezik, ami körülbelül 7 ms-os egyszeres átvitelnek (single turnover) felel meg. A restrikciós endonukleázokra azonban jóval kisebb átviteli számok (turnover number) jellemzőek. Ez lehetővé tette a "pre-steady-state" kinetikák viszonylag egyszerű vizsgálatát is. Az irodalomban eddig közölt "steady-state" restrikciós endonukleáz kinetikák Michaelis-Menten típusúnak bizonyultak.

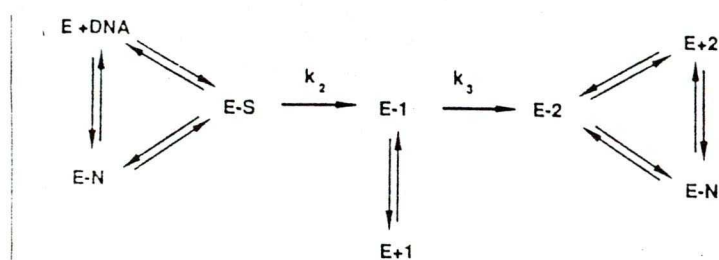
Az *ECORV* endonukleázra 0.9 ms^{-1} -os k_{cat} érték jellemző Mg^{2+} , s még kisebb (0.04 ms^{-1}) Mn^{2+} jelenlétében. A kinetikai adatoknak leginkább megfelelő reakciómechanizmus (Vermote és mtsai 1992):



ahol S, O, L a "supercoiled", "open-circle" és lineáris DNS formákat jelenti, E pedig az enzimet. Az EO köztitermék EO^* izomer állapotba kerülhet, mely már nem képes a második DNS

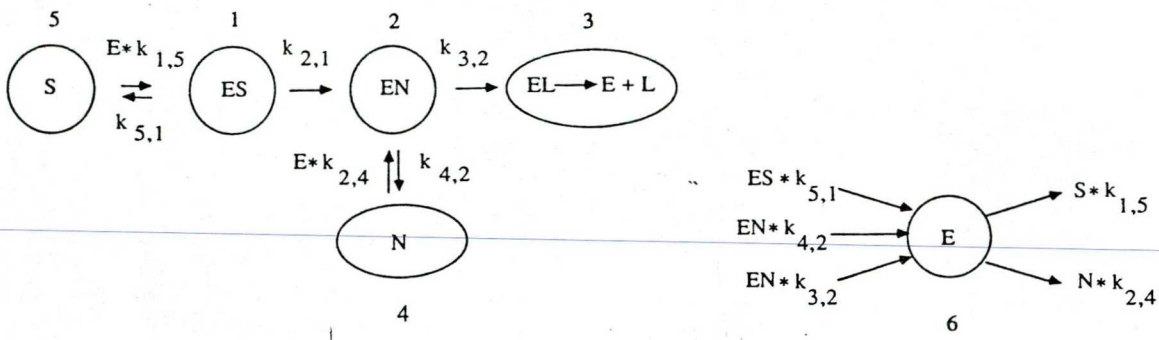
szálat hasítani. Mg^{2+} jelenlétében a k_3 sokkal nagyobb mint k_5 így az izomerizáció gyakorlatilag nem fordul elő, míg Mn^{2+} esetén igen, mivel itt a k_3 jóval kisebb (k_5 mindkét fémionra egyenlő). Az izomerizációt a protein-DNS komplexen belüli konformációváltozásnak tartják. A Mg^{2+} cseréje Mn^{2+} -ra a K_m -et háromszorosára növelte, míg a k_{cat} értékét több mint huszadára csökkentette.

Az *EcoRI* kinetikai mechanizmusára javasolt modell a következő (King és mtsai 1989):



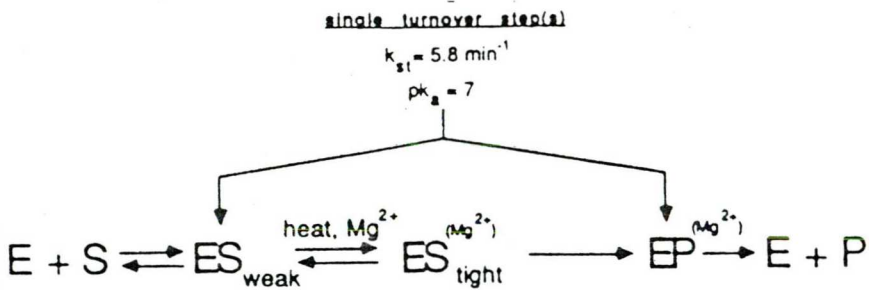
A specifikus DNS-enzim komplex (ES) kialakulását nonspecifikus komplexeken keresztül (EN) facilitált diffúzió segíti elő. E1 és E2 köztitermék egy illetve mindkét szálán elvágott *EcoRI* felismerőhelyet jelent. A 2-es az elvágott szubsztrát. Az E1 intermedier disszociációja szubsztrát-függő.

A *Bam*HI kinetikai analízise alapján javasolt modell:



S, N, L a szuperhelikális, nickelt és lineáris DNS formákat, míg E az enzimet szimbolizálja. A $k_{1,5}$ és a $k_{2,4}$ enzimkoncentráció függő, $k_{2,1}$ és $k_{3,2}$ nem.

A *Taq*I RE kinetikai modellje (Zebala és mtsai 1992):



A *Taq*I restrikciós endonukleáz a DNS két szálát két egymástól független, azonos sebességi konstansú, reakcióval hidrolizálja.

Az, hogy a közölt viszonylag kisszámú restrikciós endonukleáz kinetika Michaelis-Menten típusúnak bizonyult,

persze nem jelenti azt, hogy valamennyiük kinetikája ilyen kell legyen.

Hill és munkatársai 11 év enzimkinetikai adatait áttekintve úgy találták, hogy az enzimek minimum 22%-a eltér az egyszerű Michaelis-Menten kinetikától. Ezek 54%-a kooperativitást (pozitív, negatív vagy komplexebb kevert formájút), a fennmaradó hányad pedig szubsztrát gátlást mutatott (Hill és mtsai 1977).

A kooperativitást általában úgy definiálhatjuk mint egy molekula (kémiai csoport, kialakuló kötés) befolyását egy szomszédos molekulára (kémiai csoportra, kötés kialakulására). Egyik szubsztrát a másikra nem közvetlenül, hanem a fehérje szerkezetén keresztül hat. Ehhez az szükséges, hogy az oligomer protein egyidejűleg több szubsztrát kötésére és konformáció-változásra legyen képes.

Az enzimműködés szempontjából negatív illetve pozitív kooperativitást különböztetünk meg, a szubsztrát(ok) minőségétől függően pedig homotrop vagy a heterotrop kooperativitásról beszélünk.

A kooperativitás kinetikai jellemzői a nem hiperbolikus (pozitív kooperativitás esetén szigmoid) görbe a Michaelis-Menten féle ábrázolásmódban, az egyenestől elhajló vonal Lineweaver-Burk ($1/v$ versus $1/[S]$) féle ábrázolás esetén, illetve döntően a Hill koefficiens egytől különböző értéke ($n_H > 1$; pozitív, $n_H < 1$; negatív kooperativitás). A Hill görbe ($\log v/(V_{\max} - v)$ versus $\log[S]$) meredeksége (iránytangense) adja a koefficiens értékét. Pozitív kooperativitás esetén n_H

értéke egy és a maximális kötőhelyszám közötti érték lehet, így az segítségével becsülhető (Neet 1980; Dahlquist 1978).

2.2.5. Az izoskizomerek

Az azonos felismerő- és vágóhelyű restriktációs endonukleázok az izoskizomerek. A specifitásbeli azonosság ellenére a legtöbb esetben teljesen eltérő elsődleges szerkezetű fehérjékről van szó, s ez a nem izoskizomerekre méginkább érvényes. A szekvencia hasonlóság hiánya a nem izoskizomer endonukleázok körében arra utal, hogy egymástól teljesen függetlenül alakulhattak ki (ellentétben a metilázokkal, ahol az esetek nagy részében található homológ szakaszok a fehérje szekvenciák szintjén) (Anderson 1993).

Az *EcoRI-RsrI* izoskizomer pár esetében írtak le először a közös eredetet egyértelműen bizonyító mintegy 50%-os aminosavsorrend homológiát. A leginkább konzerváltak a szubsztrát kötésben, valamint a katalízisben szereplő aminosavrégiók bizonyultak (Stephenson és mtsai 1989). Immunológiai adatok alapján a két enzim harmadlagos szerkezete is hasonló.

Izoskizomerek közötti szignifikáns aminosavsorrendbeli hasonlóságot még a *BsuFI-MspI* (Kapfer és mtsai 1991), a *TaqI-TthHB8I* (Bárány és mtsai 1992), valamint a *BsuBI-PstI* (Xu és mtsai 1993) enzimpárnál közöltek.

2.2.6. A II-es típusú RM rendszerek klónozása

Napjainkig mintegy száz komplett és félszáz inkomplett RM rendszer klónozása történt meg. A szelekció legtöbb esetben a modifikációs vagy ritkábban a restriktációs fenotípus felhasználásán alapult.

Egy RM rendszer egy lépésben történő klónozása feltételezi, hogy a gazdabaktérium elviseli a nukleáz jelenlétét, mielőtt a teljes genomja modifikálódna. Az *E.coli* SOS rendszerével képes erre egy bizonyos fokig (Heitman és mtsai 1989), akár R^+M^- fenotípus megjelenését is lehetővé téve néhány esetben (Gingeras és mtsai 1983; Wilson 1988). Ugyanakkor sok más esetben (pl. *DdeI*, *BamHI*, *HgiDI*, *KpnI* és *StyLTI*) az endonukleáz gén klónozása csak több lépésben, előzetesen modifikált genomú gazdában volt lehetséges. Valószínű, hogy ezen rendszerek metilázai előnyben részesítik a hemimetilált szubsztrátot, így lassabban metilálják a gazda érintetlen DNS-ét.

Bár elsősorban az endonukleáz jelent toxicitást a sejtre, a metiláz jelenlétét sem mindig tűri el a baktérium. Az *E. coli*-ban több olyan mechanizmus is működik, ami felismeri az idegen DNS-t és elroncsolja azt. Ilyenek pl. a *HsdRMS* gének által kódolt *EcoK* (és az alternatív *EcoB*) rendszerek (Bickle, 1982), amelyek elvágják a bizonyos pozíciójú adenineken nem metilált DNS-eket, így akadályozzák a modifikálatlan rekombináns DNS elterjedését. Más *E.coli* endonukleázok viszont a metilált DNS-t hasítják: az *McrA/B/C* rendszerek a metilált citozint-, az *Mrr* rendszer a metilált

adenint és citozint tartalmazó DNS-t emésztik (Raleigh, 1988), s így megnehezítik a metilázok klónozását. Ezért szükséges olyan mutáns gazdákat használni, amelyek nem tartalmazzák a "belső" restrikciós rendszereket (pl. RR1 *HsdR-M+*, *McrA-B-*; K802 *HsdR-M+*, *McrA-B-*).

A legtöbb RM rendszer klónozásánál Szomolányi Éva és Kiss Antal által kidolgozott, "Hungarian trick"-ként emlegetett módszert alkalmazták (Szomolányi és mtsai 1980), mely a metiláz génjére szelektál. A metilázt kifejező konstrukciók egy része valószínűleg a nukleáz gént is hordozza, mert RM rendszerek génjei többnyire kapcsoltan fordulnak elő.

2.2.6.1. Szelekció a metiláz génre

A gazdabaktériumból génbankot készítenek. Az ezt tartalmazó plazmid-DNS populációt többszörösen megemésztik a kérdéses restrikciós endonukleázzal. Fontos, hogy a vektor is tartalmazza a kérdéses endonukleáz hasítóhelyét. Az RM rendszer metilázát hordozó gén átíródása során metilálja a klón DNS-ét, így nem emészthető. A túlemésztés után elvileg csak az a DNS marad intakt, amely a metilázt hordozó klónból származik.

Az így előkészített DNS-sel transzformálnak. Mivel csak az emésztetlen DNS transzformál sikeresen, a kinőtt telepek között nagy valószínűséggel ott lesz a metilázt hordozó klón is.

2.2.6.2. Szelekció az endonukleáz génre

Ha a metiláz és az endonukleáz gén szorosan kapcsolt, a fenti módszerrel a restriktációs endonukleáz klónozása is sikerülhet.

Az *in vivo* szelekció azon alapszik, hogy az endonukleázt termelő klón védettebb fágfertőzéssel szemben. Míg néhány klónozott RM rendszer hatékonyan megsemmisíti a fág-DNS-t (Bougueleret és mtsai 1984; Gingeras és Brooks, 1983), addig más rendszerek, bár kifejeződnek *E.coli*-ban, egyáltalán nem, vagy csak nagyon gyengén védenek a fágfertőzéssel szemben (Lunnen és mtsai 1988). *In vitro* lehetőség az enzimre jellemző hasítási mintázat kimutatása, ez azonban nem minden esetben lehetséges.

2.3. Az *EcoRI* RM rendszer

A nagyszámú ismert II-es típusú RM rendszer közül az egyik legalaposabban jellemzett az *EcoRI* rendszer. Az endonukleáz szimmetrikus homodimer fehérje, amely a GAATTC szekvenciát hasítja a G és A bázisok között, ligálható 5' ragadós végeket eredményezve (Hedgpeth és mtsai 1972). A metiláz monomer molekula, mely a két központi adenin N⁶ amino csoportját metilálva védi meg a felismerőhelyet a hasítástól. Az endonukleáz és metiláz gének egyazon DNS szálról íródnak át, az endonukleáz génen kezdve.

2.3.1. Az EcoRI endonukleáz szerkezete és működése

Az EcoRI endonukleáz α/β proteint egy α -hélixekkel körülvelt ötszálú β -lemez alkotja (Heitman 1992). A homodimer komplex az EcoRI hely középpontjára nézve szimmetrikus. Mindkét monomer rendelkezik egy-egy "karral", ami körülöleli a DNS-t és stabilizálja a komplexet. A GAATTC szekvenciát felismerő alegységrészlet két α -hélixből (külső és belső) -melyek mélyen benyúlnak a DNS nagy árkába- és egy nyújtott láncból (extended chain) áll, mely áthidalja azt (1/a ábra).

Az EcoRI endonukleáz kezdetben aspecifikusan köti a DNS-t, majd végighaladva rajta leli meg a felismerőhelyet. A szekvencia specifikus DNS kötés konformációváltozást indukál és alloszterikusan aktiválja a DNS vágást. A konformáció változások terjedhetnek az alegységeken belül, az alegységek között és egyidejűleg alegységeken belül és között. Az egyik alegység szubsztrát kötése a másik alegységen vágást eredményezhet.

A katalízisben vízmolekulából protonelvonás révén létrejött hidroxil ion játszik közre. S_N2 nukleofil támadást hoz létre a foszfátcsoporton, melyet Mg^{2+} -a katalízis esszenciális kofaktoraként- indukál, mivel koordinációs kötést létesít a foszfátcsoport oxigénjeivel (1/b. ábra).

A specifikus kötődés Mg^{2+} nélkül is megvalósul. A Mg^{2+} járulékos kontaktusok kialakulását segíti elő, feltehetően a Glu111 és Asp91 DNS-t taszító hatását csökkentve.

A két szál vágása egymás után (szekvenciálisan) történik. A vágás sebességét a felismerőhelyet szegélyező szekvenciák is befolyásolják, feltehetően a katalízist megelőző DNS konformáció változásokra hatva.

Az enzim a fiziológiástól eltérő pufferek, kofaktorok, illetve bizonyos mutációk hatására sztár (*) aktivitással bír, ami a felismerésbeli hűség "lötyögését" jelenti. Fiziológiás körülmények között *in vitro* a sztár helyeken az enzim csak az egyik DNS szálat (nicking), míg sztár körülmények között mind a kettőt elvágja. A sztár helyeken ilyenkor a vágás két különböző kötődés eredménye, mely egy szubsztrát szintű "proofreading" mechanizmus lehetőségére utal *in vivo*. Az enzim a nickelt DNS-hez kötődve a másik szálat is elvágja ha az autentikus helyről van szó, míg az *EcoRI** kötőhelyről leválik.

In vivo a gazdabaktérium genomja a felismerőhelyen metilált, tehát védett a vágás ellen, a nickeket pedig a DNS ligáz gyorsan kijavítja. Elkerülve ezzel a DNS károsodás által kiváltott SOS választ, mely hátráltatja a sejtosztódást és mutagén hatású. Ezenkívül az *EcoRI* metiláz az autentikus felismerőhelyeken kívül a sztár helyek egy részét is metilálja (túlmethylálás) (Woodbury és mtsai 1980 a, b).

2.3.2. Szubsztrát felismerés

2.3.2.1. Az első modell

Az első röntgenkrisztallográfiás méréseken alapuló modellt 1986-ban publikálták (McClarín és mtsai 1986). A katalízist meggátolandó a kristályosítás Mg^{2+} nélkül történt. A modell lényege: a monomerekről két-két α -hélix nyúlik be a DNS nagy árkába, lehetővé téve, hogy az Arg200 a guaninnal, a Glu144/Arg145 a két adeninnel létesítsen összesen 12 H-kötést. Ez biztosítaná a szekvencia-specificitást.

2.3.2.2. A módosított modell

Az újabb biokémiai, genetikai és röntgenkrisztallográfiás adatok a modell revízióját tették szükségessé (Wolfes és mtsai 1986; Needels és mtsai 1989; Heitman és mtsai 1990; Alves és mtsai 1989; Oelgeschlager és mtsai 1990). Kimutatták, hogy a fent említett aminosavak cseréje nem változtatta meg a szubsztrát-specificitást, bár némely szubsztitúciók még H-kötés kialakulását sem tették lehetővé. Sőt a kettős illetve hármas mutációk sem rontották a szubsztrát felismerést, pedig a katalízist súlyosan befolyásolták.

Az *EcoRI* endonukleáz szubsztrátfelismerési mechanizmusai a módosított modell szerint a következők (Kim és mtsai 1990; Heitman 1992):

I. direkt felismerés

1. purinbázisokkal hidrogén kötések

2.pirimidinbázisokkal van der Waals és hidrogén
kötések

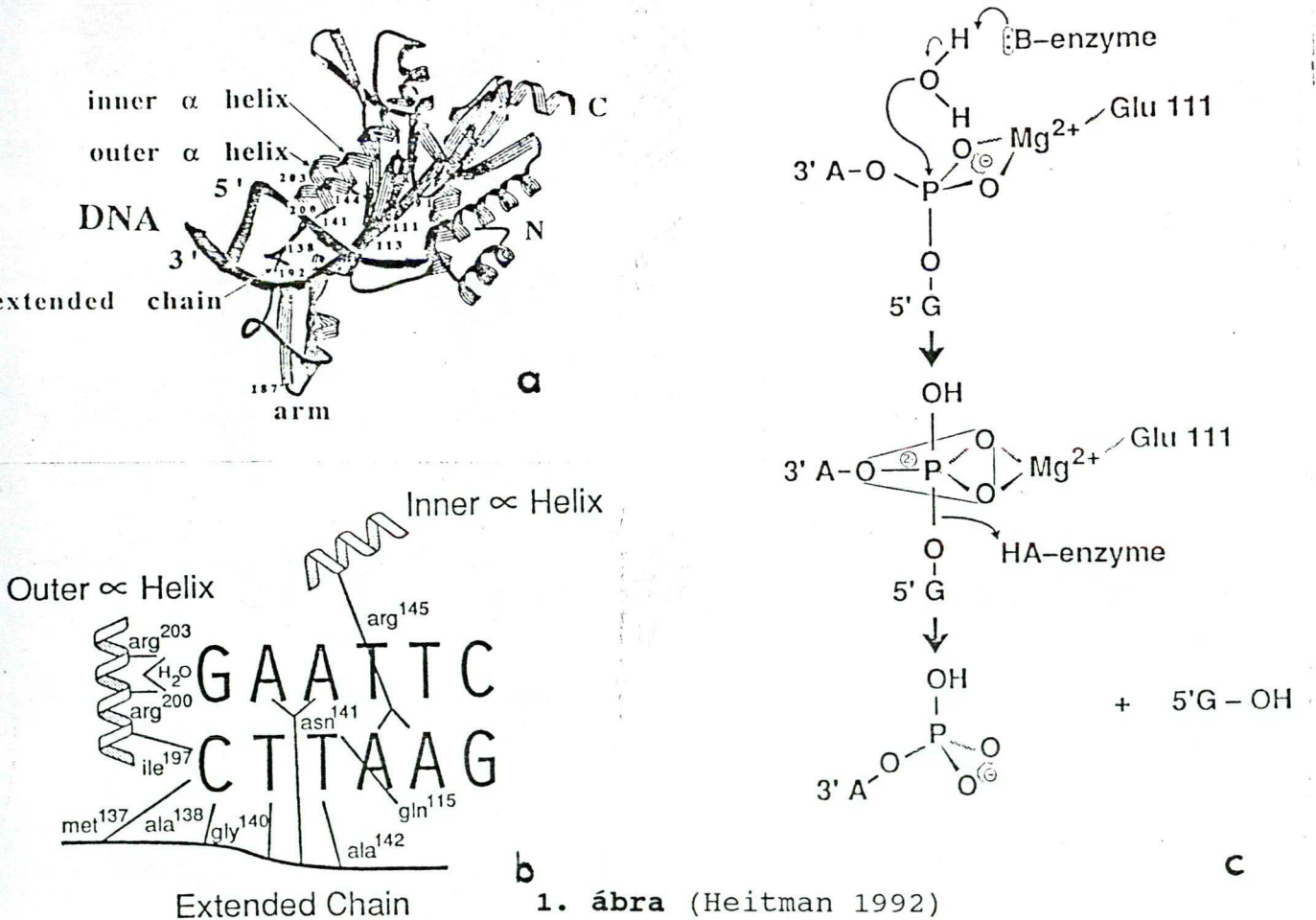
3.a felismerőhelytől kissé különböző szekvenciák
bázispárjai és a protein funkcionális csoportjai
közötti ütközések (sztár aktivitás)

II.indirekt felismerés

1.szekvencia specifikus foszfát-interakciók

2.szekvencia specifikus DNS-konformáció torzulások

Azonosították a DNS felismerő (Ala138, Asn141, Arg200,
Arg203; Gln115, Met137, Gly140, Glu192, Tyr193), valamint a
katalízisben szereplő (Pro90, Asp91, Glu111, Lys113)
aminosavakat (1/c. ábra).



1. ábra (Heitman 1992)

2.4. Az *EcoRV* restrikciós-modifikációs rendszer

Az *EcoRV* jelenleg az *EcoRI* mellett a másik legalaposabban jellemzett RM rendszer. A metiláz monomer molekula, amely a GATATC felismerőhely első adeninjét metilálja (Garnett és mtsai 1988) Az endonukleáz homodimer enzim. A fenti szekvenciát középen hasítja tompa végeket eredményezve. A két gén egy 310 bp-os intergenikus régióból kiindulva ellentétes irányban íródik át (Bougueleret et al 1984).

2.4.1. Az *EcoRV* RM rendszer szabályozása

Az *EcoRV* endonukleáz termelődésének szabályozása különböző szinteken valósul meg:

- transzláció iniciáció szintjén, gyenge riboszómakötő hely révén

- elongáció szintjén, kodon használattal

- az mRNS másodlagos szerkezete által, mely transzkripciós terminátorként képes működni. Lényegében egy, az mRNS-en az endonukleáz géntől 3' irányban elhelyezkedő "stem-loop" szerkezet jön létre. Ennek egy 7 bázisból álló szekvencia részlete párosodni képes a startkodont környező szekvenciával, így csak a naszcens mRNS tud transzlálódni, ami az endonukleáz termelés alacsony szintjét eredményezi. Mivel a metiláz mRNS-nél nem találtak ilyen strukturát valószínű, hogy a metiláz gyorsan magas koncentrációt érhet el a sejtben, megvédve annak DNS-ét (Bougueleret & al 1984).

-az *EcoRV* RM génjei között található egy 310 bp-os ORF, mely valószínűleg egy trans-acting szabályozófehérjét (*ecoVc*) kódol.

2.4.2. Szubsztrát felismerés

Röntgenkrisztallográfiás vizsgálatokkal felderítették az *EcoRV* endonukleáz kristályszerkezetét szabad illetve felismerőhelyhez vagy kissé módosított felismerőhelyhez kötött formában egyaránt (Winkler és mtsai 1991; 1993).

Az *EcoRV* egy kinyúló hurkokkal bíró α/β protein. Mind a specifikus és a nem specifikus komplexek esetén 10 bp-nyi DNS helyezkedik el a két alegység közti mély hasadékban. A dimerizáció a *dimerizációs szubdoménnek* nevezett régiókon keresztül valósul meg (19-32 ill. 150-160 aminosavak). A DNS-sel a *DNS kötő szubdomén* lép kölcsönhatásba, mely magában foglalja az αA hélix N-terminális részét és az αB hélixet (a 141-166 aminosavak kivételével). A maradék szegmensek (13-18, 33-37, 141-149, 161-165) a fenti két egység flexibilis kapcsolatát biztosítják. A DNS kis árkával beágyazódik az U alakú dimer mélyedésébe. A fehérje-DNS kapcsolódási pontok jelentős része két rövid hurkon található. A *felismerő huroknak* elnevezett szakaszt a 182-187 aminosavak (Gly-Ser-Gly-Asn-Thr-Thr) alkotják (Vermote és mtsai 1992b). E két hurok átöleli a felismert DNS szekvencia középső részét, a nagy árokba nyúlva. A dimer két felismerő hurka 6-6 H-kötést létesít a GATATC szekvencia

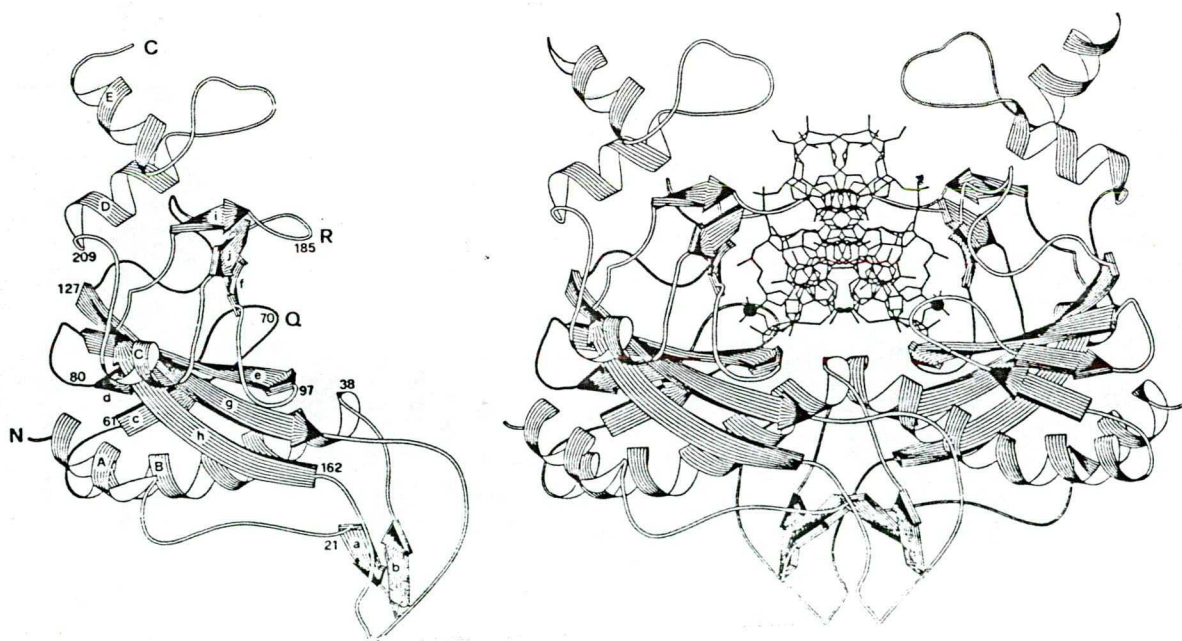


két-két szélső bázispárjával. A középső két bázispárral nem jön létre H-kötés.

A másik féle hurok egy β -kanyar (β turn) - melyet szekvenciája miatt (Gln68, Gln69, Asn70, His71) *Q* kanyarnak neveztek el - főleg a cukor-foszfát gerinccel és a kisárokban elhelyezkedő bázisokkal érintkezik. Valószínűleg az Asn70 kapcsolódik H-kötéssel a GC bázispár citozinjához és vagy az AT bázispár adeninjéhez. A kis árokban kapcsolódik még a DNS-hez a Lys38.

Cél DNS szekvencia kötődésekor járulékos kontaktusok jönnek létre a fenti két hurok között is.

Egy-egy alegység összesen 10 H-kötést alakít ki egy DNS szál cukor-foszfát gerincével, melyek közül hatot a β e lemez három aminosava létesít (92-95) (2. ábra).



2. ábra (Winkler és mtsai 1993)

Katalitikus mechanizmusként az *EcoRI*-éhez hasonló S_N2 típusú nukleofil reakciót valószínűsítenek. A kétértékű fémion szerepe itt is a reaktív foszfát csoport polarizációja és/vagy az ötértékű átmeneti állapot stabilizációja lehet. Az Asp74, Asp90, Lys92 és Asn188 aminosavak oldalláncai alakíthatják ki az aktív centrumot. Az Asp90 és Lys92 megtalálható az egyébként teljesen különböző *EcoRI* katalitikus centrumában is.

Módosított felismerőhelyet tartalmazó oligonukleotidokkal végzett kísérletek tisztázták az egyes nukleotidok szerepét a GATATC szekvencián belül. Bár a guanin $-NH_2$ csoportja révén a felismerésben is részt vesz, hiánya mégis inkább a katalízist érinti, csökkenti a reakció k_{cat} értékét. A két adenin $-NH_2$ és az első adenin N7 valamint a citozin $-NH_2$ csoportja hidrogén hidakat létesít, a két timin $-CH_3$ csoportja pedig hidrofób kölcsönhatásban vesz részt (Fliess és mtsai 1988; Mazzarelli és mtsai 1989; Newman és mtsai 1990).

Ellentétben az *EcoRI*-gyel, Mg^{2+} hiányában az *EcoRV* egyforma affinitással kötődik a DNS bármely szekvenciájához beleértve a felismerő helyet is (Taylor és mtsai 1991). A specifikus és nem-specifikus komplexek izoenergetikusak, de nem izosztérikusak, ugyanis a specifikus komplex DNS-ének szerkezete jelentős mértékben torzult a szabályos B DNS struktúrához képest. Itt az enzim kb. 45° -os hajlatot idéz elő a DNS-en, míg a nem-specifikus komplexben nem mérhető a DNS torzulása (Stoeveer és mtsai 1993). A protein harmadlagos

szerkezete szintén eltérő a kétféle kötődés esetén. Az autentikus szekvencia konformációváltozást indukálva segíti elő a katalitikus centrum kialakulását.

Mg^{2+} jelenlétében elsőként szintén az enzim-DNS kapcsolat alakul ki. Amennyiben az *EcoRV* restrikciós endonukleáz az autentikus szekvenciához kötődik, nagyobb az affinitása a Mg^{2+} ionok felé, és létrejön egy energetikailag stabil enzim-DNS- Mg^{2+} komplex. A Mg^{2+} "rögzíti" az enzimet a felismerőhelyen. Amikor viszont a GATATC-től eltérő szekvencián "ül" az endonukleáz, Mg^{2+} iránti affinitása jóval kisebb. Az enzim-DNS- Mg^{2+} komplex kialakulása energetikailag kedvezőtlen, így az *EcoRV* továbbcsúszik a DNS-en (Thielking és mtsai 1992).

Végsősoron az *EcoRV* aktivitása egy adott DNS szakaszon az enzim-DNS komplex fémionnal való telítettségével arányos. A kettős szál elvágásához mindkét alegység Mg^{2+} -ot (vagy Mn^{2+} -t) kell kössön. A magnézium iránt nagy affinitású fémion kötő hely viszont csak a felismerőhelyet tartalmazó enzim-DNS komplexben alakul ki. A Mg^{2+} kötődése megnöveli a kontaktusok számát így a kötés energiáját, melynek egy része a DNS torzítására, más része pedig a katalitikus központ aktiválására használódhat fel.

A fémion kötő hely kialakításában szereplő aminosavak mutációja illetve egy nem autentikus DNS szekvencia kötése azt eredményezi, hogy az enzim kofaktorkötő helye és így fémion igénye is megváltozik ($Mg^{2+} \rightarrow Mn^{2+}$). A 185-ös és 188-as Asn cseréje Ala-ra a felismerőhely bázisaira

specifikus kontaktusokat szüntet meg, mégsincs jelentős hatása a DNS kötésére. Ehelyett a mutációk helyétől távoli Mg^{2+} kötést zavarja meg. Ez az enzim egymástól térben jól elhatárolt régiói közt fennálló molekuláris kommunikációt valószínűsít. Feltehetően a bekötődött DNS konformáció-változása szerepel mint közvetítő (Vermote és mtsai 1992b).

Az *EcoRV* restrikciós endonukleáz az autentikus felismerőhelyeken kívül nagyszámú alternatív helyet is képes elvágni (sztár aktivitás). Az alternatív helyek 1 bázispár eltérést mutatnak az autentikus helyekhez képest, kivéve a két szélső bázis cseréjét egy másik fajta bázisra. A kétféle helyen mérhető aktivitás a diszkriminációs faktoral jellemezhető, mely $3 \cdot 10^5$ az autentikus hely javára (Vermote és mtsai 1992a). Bár kimutatták, hogy az *EcoRV* metiláz nem csak a GATATC szekvenciát metilálja hanem a *dam* helyeket is, a túlmetilálásnak mégsincs olyan jelentős szerepe a gazda genomjának védelmében, mint az *EcoRI* rendszernél.

A proofreading mechanizmus alapja a DNS ligáz működése (Taylor 1990). Az autentikus felismerőhelynél az endonukleáz kapcsolt reakciómechanizmussal egyidejűleg hasítja a két szálat. Az alternatív helyeknél ezzel szemben két lépésben történik a kettős szál vágása. Elvágja egyik szálat, ledisszociál a DNS-ről, majd egy újabb kötődés után vághatja el a második szálat. Ha a rendszer nem telített magnéziummal az autentikus helyeken is két lépésben vág az enzim. A ligáz sokkal nagyobb aktivitással foltozza be a nickeket, mint egyesít két tompa végű DNS szálat. Végeredményben a kezdeti

nickek kijavítása nem párosul a duplaszálú törések
újraegyesítésével.

3. CÉLKITŰZÉS

Célunk a laboratóriumunkban 1986-ban felfedezett restriktációs endonukleáz biokémiai jellemzése volt. Az enzim gazdáját -mely egy a *StuI* restriktációs endonukleázt termelő baktériumtenyészetet szennyező kolóniaként hívta fel magára a figyelmet- *Corynebacterium equi*-ként azonosította a KÖJÁL mikrobiológiai laboratóriuma.

Az izolált *CeqI* restriktációs endonukleáz (a továbbiakban a *CeqI* névvel az endonukleázt jelölöm, mivel a metilázt nem vizsgáltuk) a II. típusú restriktációs enzimek csoportjába tartozik. Az általa felismert szekvencia (GATATC), és a hasítás helye azonos az *EcoRV* endonukleáznál leírttal (Duda és mtsai 1987). Mivel az *EcoRV* az egyik legintenzívebben kutatott, és ennek eredményeképpen legalaposabban jellemzett restriktációs enzim, a *CeqI* szerkezetéről és működéséről szerzett adatok lehetővé teszik a két azonos specifitású rendszer összevetését. Ehhez mind struktúrális, mind pedig funkcionális szempontból vizsgálni kellett az *CeqI*-et.

Már a *CeqI* izolálásának kezdeti lépései során feltűnt, hogy a restriktációs endonukleázok többségéhez képest szokatlan tulajdonságokkal rendelkezik. Az enzimaktivitás ultracentrifugálás során kiülepedett, ami az enzim molekulák valamiféle aggregációját jelezte. A membránhoz kötöttséget nem lehetett egyértelműen kizárni. Kézenfekvő volt az aggregátum természetére vonatkozó kérdések felvetése. Műtermék-e? Homogén-e? Disszociálhatóságának mik a

feltételei? Mi az enzimaktivitás szerkezeti alapegysége? A különleges struktúrális tulajdonságok befolyásolják-e az enzimműködést, és ha igen hogyan?

Egy fehérje alapos jellemzéséhez nélkülözhetetlen elsődleges szerkezetének (aminosavsorrendjének) ismerete, ezért végül, de nem utolsó sorban célul tűztük ki a CeqI RM rendszer génjeinek *E.coli*-ban történő kifejeztetését, és nukleotidsorrendjeik meghatározását.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. A *Corynebacterium equi* tenyésztése

A baktérium növesztése YTA táptalajon történt. A késői log fázis elérése után a baktériumot további 48 óráig, 4 °C-on inkubáltuk. A telepeket lekapartuk a lemezekről. Az összegyűjtött masszát egyszer mostuk fiziológiás sóban, majd centrifugálás után felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

4.2. A *Corynebacterium equi* feltárása

A baktérium feltárására 3 különböző módszert is használtunk: X-press; French-press, ill. ultrahangos feltárás. Mindhárom esetben a feltáró puffer PC (10 mM kálium-foszfát pH 7,4; 0,1 mM EDTA; 10 mM merkaptoetanol) volt.

4.3. A CeqI részleges tisztítása

- A feltárt baktérium-masszát (kb 20-30 g) centrifugáltuk (Beckman centrifuga, JA-20 rotor, 16000 rpm, 4 °C, 20 perc);
- a felülúszóhoz streptomycin-szulfátot adtunk 1 %-os végkoncentrációig (0 °C, 30 perc), lassan kevertettük;
- ismét centrifugáltunk (12000 rpm, 4 °C, 20 perc);

-a felülúszót ammónium-szulfáttal 70 %-ig telítettük. (lassan kevertettük 4 °C-on, éjszakán át, 2 M Tris-sel fenntartva a pH 7,4-et);

-újabbli centrifugálás után (18000 rpm, 4 °C, 20 perc) a csapadékot dializáltuk PC-vel szemben (*CeqI*(1) preparátum);

-az így nyert oldatot DEAE-52 oszlopra vittük (60 cm³), amit mosatás után ($A_{280} < 0,1$), 3-3 oszloptérfogatnyi 0,15 M; 0,4 M; 0,8 M és 1 M KCl/PC oldatokkal eluáltunk.

A *CeqI* aktivitás a 0,4 M - 1 M KCl tartalmú frakciókban volt mérhető. Az összegyűjtött, aktivitást mutató eluátumot PC pufferrel szemben dializáltuk, majd PC + 50 % glicerinn tartalmú pufferben betöményítettük (4 °C, 48 óra). Az így nyert *CeqI*(2) preparátum mentes minden egyéb nukleáz ill. foszfatáz szennyezéstől, -20 °C-on tárolva legalább két évig megtartja aktivitását (Duda és mtsai 1987).

4.4. Az enzimpreparátum tárolása

- 50 % glicerint tartalmazó PC pufferrel szemben való dializálás során (4 °C; éjszakán át) az enzim kb. 3-ad részére töményedik és -20 °C-on legalább két évig különösebb aktivitásvesztés nélkül tárolható.

- Nagyon jó hatásfokkal tárolható az enzim -70 °C-on a következőképpen. Az enzimet tartalmazó oldatot pipettával kb. 50 µl -es aliquotokban folyékony nitrogénbe csöpögtetjük, majd a keletkezett "gyöngyöket" -70 °C-ra helyezzük.

4.5. Enzimaktivitás mérés

A *CeqI* aktivitásának meghatározására 1 μg DNS-t inkubáltunk (1 óra, 37 °C) 50 μl végtérfogatú A pufferben (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT) A reakciót "STOP" oldattal (0,1 % Bróm-fenolkék; 0,2 M EDTA; 50 % glicerin) állítottuk le.

A reakció eredményét 1,4 % agaróz gélen etídium-bromid festés után UV-lámpa alatt tettük láthatóvá.

Az enzimaktivitás meghatározása definíció szerint történt (1 egységnyi (U) restriktós endonukleáz 1 μg *lambda* fág DNS-t, 1 óra alatt; 37 °C-on, 50 μl térfogatban teljesen megemészt).

4.6. A *CeqI* preparátum ultracentrifugálása

4.6.1. PC pufferben

200 U *CeqI*(2) preparátumot (10 ml térfogatban, PC pufferben) 10 órán át centrifugáltunk (33 000 rpm, 4 °C).

4.6.2. Szacharóz grádiensen

Ultracentrifuga csövekben 5-20%, ill. 5-30 %-os, lineáris szacharóz grádienszt készítettünk a következő módon: a töményebb oldat került a cső aljára, majd erre óvatosan rárétegeztük a hígabb cukoroldatot. A centrifugacsöveket lezártuk, majd a csöveket kissé megdöntve rögzítettük (2 óra, szobahő). Az ez idő alatt kialakult grádiens felszínére

CeqI(2) preparátumot rétegeztünk 100 μ l térfogatban. Az egyes kísérletekben az oldatok PC puffert vagy PC + 1M NaCl-tartalmaztak. A csövekből "Autodensiflow" (Büchel Inst.) készülékkel, felülről lefelé haladva frakciókat szedtünk, amelyeknek meghatároztuk az aktivitását. Kontrollként elvégeztük a frakciószedést és az aktivitásméréseket egy hasonlóan összeállított, de nem centrifugált csőből is. A következő markerfehérjéket használtuk kalibrálásra: *ferritin* (440 kDa); *kataláz* (232 kDa); *bovin szérum albumin* (67 kDa) illetve *ovalbumin* (45 kDa); *hemoglobin* (64,4 kDa); *citokróm C* (12,4 kDa). Az egyes fehérjék relatív vándorlását határoztuk meg az ovalbuminhoz ill. a katalázhoz viszonyítva.

4.7. A *CeqI* kicsapása és mosása szerves oldószerekkel

200 U *CeqI*(1) preparátumot 200 mM KCl jelenlétében, 2 térfogat -20 °C-os acetonnal kicsaptunk;

- 3' centrifugálás, 0 °C;
- csapadékot hűtött "speed-vac"-ban szárítottuk;
- metanol : kloroform; 1 : 1 arányú keverékével mostuk;
- PC pufferben újraoldottuk;

4.8. A *CeqI* molekulatömeg szerint való elválasztása

Tisztított *CeqI* preparátumot kromatografáltunk Sephacryl-300 gélfiltráló oszlopon (8*400 mm).

a/ PC puffer

b/ PC puffer + 1 M KCl

c/ PC + 0,1 % Triton X-100

tartalmú pufferekben. A következő markerfehérjéket használtuk kalibrálásra: *ferritin* (440 kDa); *kataláz* (232 kDa); *bovin szérum albumin* (67 kDa);

Az előbbihez hasonló kísérletben 100 U részlegesen tisztított *CeqI*(2)-et kromatografáltunk az S-300 oszlopon R pufferben 1, 0.2 és 0 mg/ml ultrahangozott csirkevér DNS jelenlétében (0.5-1 kb méretű fragmentek).

Megmértük az egyes frakciók térfogatát ill. enzimaktivitását (a só ill. a detergens 10 x-es hígítása után). Összaktivitást becsültünk a frakciókban mért aktivitások összegzésével. Kiszámoltuk az egyes frakciók relatív aktivitási értékeit, amelyet az összaktivitás százalékaként határoztunk meg.

4.9. DNS preparálási módszerek

4.9.1. A plazmidok preparálása az alkáli-extrakciós módszer szerint történt (Clewell és mtsai, 1972). A DNS-t szükség esetén tovább tisztítottuk Et-Br/CsCl sűrűségrádiensen vagy Sephacryl-300 gélfiltráló oszlopon.

4.9.2. A restrikciós emésztésekkel előállított DNS-fragmentek izolálásakor a DNS darabokat agaróz gélen választottuk szét, majd méretüktől függően DEAE-membrán segítségével ill. dializáló hártýára való futtatással



eluáltuk az agarózból. Fenol-kloroform extrakcióval, majd azt követően etanolos kicsapással tovább tisztítottuk. A fragmentek koncentrációjának meghatározása "*EtBr dot-quantitation*" módszerrel történt (Ausubel és mtsai., 1987).

4.9.3. A kísérletekben felhasznált *oligonukleotidokat* (CCGGGTTATCCCGG; CCGGGATATCCCGG) tisztított állapotban, készen kaptuk Dr Alfred Pingoud (Hannover) ill. Dr Szilák László (Biokémiai Intézet) jóvoltából.

4.10. A DNS radioaktív jelölése

-3'túlnyúló végen: $-(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{dATP}$ és Klenow fragment felhasználásával;

-5'tompa végen: $-(\gamma\text{-}^{32}\text{P})\text{ATP}$ jelenlétében T4-polinukleotid kinázzal történt. A reakciókat Maniatis és mtsai. ajánlásai alapján állítottuk össze (Maniatis és mtsai, 1982, 1989).

4.11. Kooperáció-vizsgálat a CeqI endonukleáz alegységei között

4.11.1. Emésztési reakciók:

i./ CCGGGATATCCCGG bázissorrendű oligonukleotidot emésztettünk (egy tipikus emésztési reakcióelegy kb. 3000 cpm 5'végen jelölt oligonukleotidot; 100 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM DTT) tartalmú puffert és 2 U enzimet tartalmazott 20 μl -es térfogatban (14 $^{\circ}\text{C}$, 1 óra)). A puffer

a 10. ábrán jelzett arányban tartalmazott MgCl_2 -t illetve MnCl_2 -t. Az emésztményt 20 %-os 7 M ureát tartalmazó (29:1; akrilamid:bisz-akrilamid) poliakrilamid gélen futtattuk (35 x 50 cm; 1000 V; 5 óra). a nedves gélét ORWO röntgen filmen autoradiografáltuk.

ii./ Az i./ pontban jelzett reakciókörülményeket állítottuk be pBR322 *Hind*III-BamHI, 346 bázispáros, egy *Ceq*I felismerőhelyet tartalmazó, mindkét végén α - ^{35}P dATP-vel radioaktívan jelölt fragmentjének emésztésekor is. Az emésztési reakció körülményeit az enzimpreparátum hígításával úgy hangoltuk össze, hogy részleges emésztést kapjunk (50 ng jelölt fragmentet emésztettünk 2 U enzimmel (30 másodperc, 37 °C). A reakcióelegyekhez különböző mennyiségű *Ceq*I felismerőhelyet vagy annak módosított változatát adtuk (CCGGGATATCCCCGG, CCGGGTTATCCCCGG).

A reakció termékeit 1,5 %-os agaróz gélen futtattuk, a géleket Whatmann 3MM papírra szárítottuk, majd autoradiografáltuk.

4.11.2. A kísérletek kiértékelése:

i./ Az előhívott film segítségével azonosítottuk az egyes radioaktív csíkokat. Ezeket kivágtuk, celofánra szárítottuk és toluolos szcintillációs koktélban Beckman folyadék szcintillációs számlálóval mértük.

ii./ Az autoradiogramot Beckman DUv8 denzitométerrel analizáltuk.

A $D/(D + U)$ értéket határoztuk meg (D:emésztett; U: emésztetlen).

4.12. CeqI-DNS kötés vizsgálata "mobility shift" elektroforézissel.

4.12.1. Specifikus DNS próba előállítása a kötési kísérletekhez

A kötési kísérletekhez használt pPC9 jelű plazmid a pUC19-ből származik. Egy CeqI felismerőhelyet tartalmazó, GGGATATCCC szekvenciájú, palindróm tulajdonságú oligonukleotidot építettünk be a pUC19 polilinker SmaI helyére. A CeqI felismerőhelyet egy kópiában tartalmazó klónt használtuk a továbbiakban (pPC9), amelyből EcoRI-HindIII kettős emésztéssel nyertünk egy a CeqI felismerőhelyet tartalmazó, 61 bp hosszúságú fragmentet, amelyet radioaktívan jelöltünk (α - ^{32}P)dATP jelenlétében, Klenow fragment segítségével (Maniatis és mtsai, 1982)). A fragment koncentrációjának meghatározását etidium bromid "dot-quantitation" módszerrel végeztük (Ausubel és mtsai, 1987).

4.12.2. A kötési reakció

Egy tipikus reakcióelegy a következőket tartalmazta 20 μl -es végtérfogatban: 1 μg poly-dI.dC, 0,003-3,0 pmol enzim (nyers kivonat vagy részlegesen tisztított forma), kötő puffer (100 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 1 mM DTT; 200 μg

BSA; 5 % glicerín). Szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk az elegyet, majd hozzáadtuk a specifikus próbát (10 ng - 2,7 pmol - pPC9 *EcoRI-HindIII*, mindkét végen jelölt fragment), amivel még inkubáltuk további 30 percig. Amikor tisztított enzimpreparátummal dolgoztunk (*CeqI*(2)), 1,3-0,0065 pmol *CeqI* enzimet használtunk ill., 5 ng (1,35 pmol DNS fragmentet). Volt, hogy a kötőpuffer EDTA helyett 1 mM magnéziumot tartalmazott. A reakcióidő lejárta után glicerín-brómfenolkék oldatot adtunk az elegyhez, majd 4,7 %-os, natív poliakrilamid gélen futtattuk.

4.12.3. Gél elektroforézis

A fehérje-DNS komplexeket 4,7 %-os poliakrilamid gélen (29:1; akrilamid : bisz-akrilamid) elemeztük, alacsony ionerősségű (50 mM NaCl, 0.6 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7.5) pufferben. A géleket minden esetben 100 V, 30 mA-en 30 percig előfuttattuk. A minták elektroforézise 140 V-on, 50-60 mA-en folyt, az elektroforézis-puffer állandó cirkuláltatásával 25 °C alatti hőmérsékleten.

4.12.4. Autoradiográfia

A jelölt fragmenteket tartalmazó gél Whatman 3MM papírra szárítottuk. Az autoradiográfia ORWO röntgen filmen történt.

4.13. Kinetikai vizsgálatok

4.13.1. pBR322 plazmidot PvuII enzimmal linearizáltunk, amely így egy CeqI felismerőhelyet tartalmazott körülbelül a DNS szekvencia "közepén". Ez szolgált később az enzim szubsztrátjaként, radioaktívan jelölt, vagy "hideg" formájában. A szubsztrát koncentrációja 0,125 és 10 nM között változott. A reakciókhoz részlegesen tisztított (1) illetve tisztított CeqI(2) preparátumot használtunk. Az enzim szubsztrát koncentrációk arányát úgy állítottuk be, hogy 15 perc alatt körülbelül 20-80 %-os részleges emésztést kapjunk. A reakciótermék versus idő grafikon 40 percen túl hagyta el a lineáris tartományt. 10-, 15- és 20 perc inkubálás után a reakciót leállítottuk 2 μ l STOP oldat hozzáadásával és 1%-os agaróz gélen megfuttattuk. A gélekről készített fotónegatívokat, ill. az autoradiogramokat Beckmann DUv8 spektrofotométeren analizáltuk (Depew és mtsai, 1975; Conrad és mtsai, 1989), valamint a kivágott DNS-tartalmú gél darabkák radioaktivitását szcintillációs számlálóval mértük. Az emésztett szubsztrát százalékos arányát határoztuk meg a $D/(D + U)$ képlet (D:emésztett; U: emésztetlen) alapján.

4.13.2. A kinetikai adatok illesztését a kezdeti reakciósebesség versus szubsztrát koncentráció függvényhez Dr Marc Eberhard COSY nevezetű programjával végeztük. Matematikai alapját két nem lineáris legkisebb négyzetek

algoritmus képezi; a Marquard és az ELORMA eljárás (Eberhard 1991).

4.14. A CeqI restriktációs-modifikációs rendszer klónozása

4.14.1. Kromoszómális DNS készítése *C.equii*-ből

A kromoszómális DNS tisztítása egy Izsvák Zsuzsa által kifejlesztett módszer szerint történt:

-a baktériummasszát (kb 10 g) 20 ml TEN + 0.1 % sarkosyl pufferben mostuk;

-felvettük 7 ml TEN puffer; 0,7 ml SDS; 1 ml proteináz-K (10 mg/ml) tartalmú oldatban, majd éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on.

-egy térfogat TE-vel telített fenolt adtunk hozzá. Tekintélyes mennyiségű csapadék keletkezett, amit a felülúszótól elválasztottunk:

-a csapadékot TEN pufferben szuszpendáltuk, majd 0,4 térfogat ammónium-acetát (5 M) jelenlétében 2 térfogat izopropanollal szobahőn kicsaptuk. Centrifugálás után (10', 8000 rpm), a felülúszót elöntöttük, a csapadékot megszárítottuk, majd felvettük TE pufferben. A nem oldódó anyagot kicentrifugáltuk. Az így nyert DNS oldatot egyesítettük a felülúszóval, amit háromszor extraháltunk fenol/kloroformmal, majd kicsaptuk etanollal.

A kromoszómális DNS méretét ill. minőségét 0.5 %-os agaróz gélen ellenőriztük.

TEN puffer:

50 mM Tris-HCl

20 mM EDTA

50 mM NaCl

TE puffer:

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

4.14.2. Génbank készítés

A *Corynebacterium equii*-ből készített kromoszómális DNS-t részlegesen emésztettük R MboI-el. Az emésztés körülményeit az enzim hígításával úgy állítottuk be, hogy a kapott fragmentek mérete kb. 2-7000 bp között mozogjon.

A **Lambda-pGY97** (Ampicillin rezisztenciát hordozó) fágmid-vektort (Vincze & Kiss, 1990) R XhoI és R XbaI enzimmel megemésztettük, majd defoszforiláltuk CIP enzim segítségével. A vektort továbbemésztettük R BamHI-el, amely így készen állt az R MboI-el részlegesen emésztett genomiális DNS befogadására. A vektort az inszerttel (2 : 1 arányban keverve) ligáltuk (50 mM Tris-HCl (pH 7,4; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM spermidin; 1 mM ATP; 12 % PEG-6000; 100 ug/ml BSA pufferben, 16 °C, 4 óra), amit etanolos kicsapás követett. A DNS-t TE pufferben újraoldottuk, majd *in vitro* pakoltuk, amivel K-1400 jelű gazdát fertőztünk.

4.14.3. In vitro pakolás

A ligált DNS-t *in vitro* pakoltuk (Scalenghe és mtsai 1981).

4.14.4. K-1400 jelű gazda fertőzése

Lényegében a Sambrook és munkatársai (1989) által javasolt eljárást követtük, azzal a kivétellel, hogy a gazda sejtet (*E. coli* K-1400, *supE*, *supF*, *hsdS*⁻, *recA56*, *Mcr*⁻, *lambdaL512 delcIII-int*) 32 °C-on növesztettük.

4.14.5. Szelekció CeqI metilázra

A génbankot képviselő plakkokat fiziológiás sóban összemostuk, 100 ml ampicillin tartalmú YTB táptalajban éjszakán át, 28 °C-on továbbnövesztettük, majd fágmidot preparáltunk belőle (Clewell 1972). A fágmid-preparátumot 200 µl -es térfogatban háromszor emésztettük CeqI-el (Szomolányi és mtsai 1980).

Az emésztések között a DNS-t tisztítottuk fenol/kloroformos extrakcióval ill. etanolos kicsapással. Az ily módon kezelt plazmid-DNS valószínűleg teljesen emésztett állapotú volt. Az emésztménnyel K-1400-at transzformáltunk, mely sejttípusban a fágmid nem fágként, hanem plazmidként viselkedik. A fágmid DNS igen nagy mérete miatt (ami rontja a transzformáció hatásfokát) egy módosított módszert alkalmaztunk a DNS gazdába való juttatására.

4.14.6. Módszer a szokásosnál nagyobb plazmid transzformálására

A kompetens sejt készítéshez a baktériumot (K-1400) éjszakán át növesztettük, majd másnap 2 ml-t oltottunk 80 ml LB táptalajra, ahol OD₅₅₀=0.5 növesztettük;

- 5 percig centrifugáltuk (3000 g, 4 °C);
- 20 ml 0,1 M-os $MgCl_2$ -ban szuszpendáltuk, 0 °C-on;
- 5 ml-es aliquotokban újra centrifugáltuk (1500 g, 10 perc, 4 °C);
- a centrifugált sejteket 4 ml $CaCl_2$ -ban szuszpendáltuk fel;
- 0 °C-on inkubáltuk 1 órát;
- A fágmid-DNS-t 500 μ l 0.1 M $CaCl_2$: 1 x SSC; 4:3 arányú keverékben, 100 ng mennyiségben adtuk az így elkészített kompetens sejthez;
- 0 °C-on inkubáltuk 1 órát;
- 32 °C-on hősokkoltuk 5 percen keresztül;
- ismét 0 °C-on tartottuk 2-3 percig;
- 5 ml YTB táptalajt adtunk hozzá;
- 2 órát rázattuk 32 °C-on;
- centrifugáltuk 10 percig, 1500 g;
- fölveltük 500 μ l YTB-ben és lemezeltek 50 ug/ml ampicillint tartalmazó táptalajra;

4.14.7. Szelekció CeqI endonukleázra

A CeqI metilázt hordozó klón szerencsés esetben tartalmazhat endonukleáz gént is, amelynek a kimutatására következő vizsgálatokat végeztük:

-a rekombináns klónokat lambda-fággal fertőztük (Bougeleret és mtsai 1984) és vizsgáltuk van-e különbség az egyes klónok fágfertőzéssel szembeni érzékenységében.

-a klónokat $OD_{550} = 0,7$ -ig növesztettük 28 °C-on, nyers kivonatot készítettünk belőlük, majd lambda-DNS-t és A puffert tartalmazó reakcióelegyben inkubáltuk 5, 10, 15 percig, 37 °C-on. Az emésztési képet agaróz gélen vizsgálva DNS/CeqI hasítási mintázatot kerestünk.

4.14.8. A DNS szekvencia meghatározása (Sanger féle) láncterminációs módszerrel

4.14.8.1. Klónozás M13 fágokba (M13mp19, M13mp18), transzformánsok szélesztése

A kétszálú M13 vektorba való ligálás után (Maniatis és mtsai., 1989), JM109 ill. XL1Blue jelű *E.coli* kompetens sejteket transzformáltunk. A transzformánsokat lemezenként 20 µl /0,2 M IPTG-t, 40 µl 2% X-gal-t és 200 µl éjszakán át növesztett JM109 ill. XL1Blue jelű *E.coli* startert tartalmazó 45 °C-os 0.7%-os fedőagarba kevertük majd lemezekre kiöntöttük. 12-16 órás inkubálás (37 °C) után a fehér színű plakkokra szelektáltunk. JM109 esetében minimál táptalajjal, XL1Blue esetén tetraciklinnel szelektáltunk F' szexpilusra.

4.14.8.2. Fertőzés M13 fággal

- 2 ml 2 x YT tápfolyadékban 20 µl sűrű éjszakán át növesztett JM109 vagy XL1Blue jelű baktériumtörzset fággal fertőztünk és 6-8 órán át 37 °C-on rázattuk.

4.14.9.3. Az M13 klón ellenőrzése elektroforézissel

- A fággal fertőzött baktérium tenyészetet 5 percig centrifugáltuk.

- az előző lépést a felülúszóval megismételtük.
- a tiszta felülúszóból 20 μ l -t agaróz gélre vittünk (0,2 % SDS tartalmú felvivőpufferben).
- a rekombináns fág nagyobb mérete alapján rendszerint jól azonosítható volt.

4.14.8.4. Egyszálú fág-DNS izolálása

- 1 ml 2-szer centrifugált felülúszóhoz 250 μ l (2,5 M NaCl; 20 % PEG-6000) tartalmú oldatot adtunk.
- inkubáltuk 4 °C, 1 órát;
- kétszer centrifugáltuk (10 és 1 percre), a PEG-es oldatot mindkét esetben eltávolítottuk.
- a csapadékot újrassuszpendáltuk 200 μ l TE pufferben.
- extraháltuk fenol/kloroformmal ill. kloroformmal, majd etanollal kicsaptuk.

4.14.8.5. A szekvenálási reakció

A szekvenálás lánterminációs módszerrel (Sanger 1977), S^{35} -ATP (Amersham) alkalmazásával az United States Biochemical, Sequenase Version 2.0 jelű szekvenáló készletével történt. A reakció során követtük az USB által javasolt lépéseket.

4.14.8.6. Elektroforézis, gélszárítás, autoradiogram készítés

A szekvenálási reakciók termékeit (7 M urea; 1 x TEB) tartalmú, szekvenáló gélekre vittük, majd 1000 V-on futtattuk őket. A kész géleket az urea eltávolítása után Whatmann 3MM jelű szűrőpapírra helyeztük, majd gélszárítóval

szárítottuk. Rendszerint éjszakán át autoradiografáltunk,
szobahőn.



5. EREDMÉNYEK

5.1. A *Corynebacterium equi* tenyésztése

A *Corynebacterium equi* egy feltűnő élénkvörös pigmentet tartalmazó baktériumfaj.

Növekedése viszonylag lassú, 37 °C-on körülbelül egy hét alatt éri el a logaritmikus fázist. Próbálkozásaink gyorsabb növekedés elérésére sikertelenek maradtak. Tapasztalatunk szerint a baktérium endonukleáz tartalma akkor volt legmagasabb, ha a 37 °C-on késő logaritmikus fázisig tenyésztett telepeket 48 órán keresztül 4 °C-on továbbnövesztettük. A telepek színe ilyenkor a téglapiros színből bíborba váltott. Az alacsony hőmérséklet szerepét a jelenségben nem ismerjük. Elképzelhető, hogy a *Corynebacterium equi* a hőmérséklet drasztikus csökkenése egyfajta "stressz"-t jelent a sejt számára és a hatására indukálódó gének termékei szabályozó hatást fejtenek ki az RM rendszerre, fokozhatják génjeinek expresszióját. Ezt a feltevést látszik alátámasztani, hogy a fágfertőzés is stressz a baktérium számára, és vannak arra utaló adatok, hogy a két rendszer szabályozása kapcsolatban áll egymással (Lal és mtsai, 1988).

Táptalajok közül az általánosan használt YTA volt a legmegfelelőbb. A *Corynebacterium equi* közepesen sótűrő, 500 mM NaCl-ot tartalmazó táptalajon még jól nő, viszont az 1 M-os koncentráció már gátolja a szaporodást.

5.2. A *Corynebacterium equi* feltárása

A baktérium feltárására háromféle módszert használtunk. A *Corynebacterium equi* Gram-pozitív baktérium, míg az általánosan használt *Escherichia coli* Gram-negatív festődésű. A sejtfalszerkezeti különbség abban is megmutatkozott, hogy a *Corynebacterium equi* sejtfala sokkal ellenállóbbnak bizonyult az alkalmazott mechanikai hatásokkal szemben.

A viszonylag szívós sejtfal roncsolására az ún. Express készülék bizonyult a leghatékonyabbnak és egyben a legkíméletesebbnek (még a genomi DNS is ép maradt).

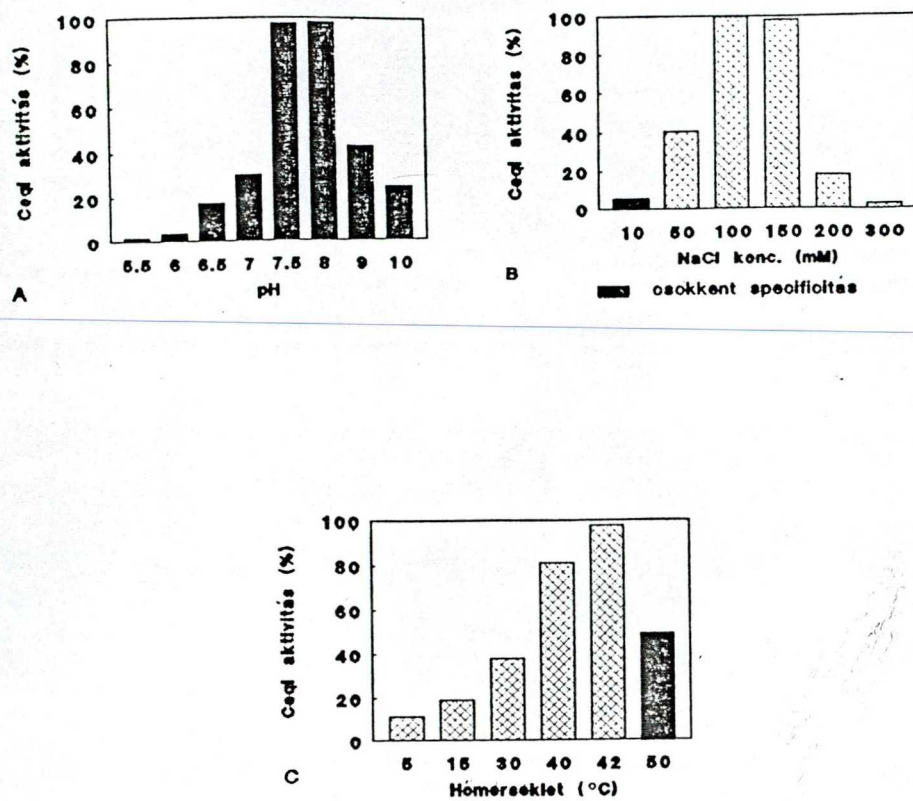
5.3. A *Corynebacterium equi* fehérjeparátum ultracentrifugálása

Érdekes jelenségre lettünk figyelmesek a CeqI parátum részleges tisztításának kidolgozása közben. A nyers extraktum néhány órás ultracentrifugálása során piros színű üledék keletkezett, amely a CeqI aktivitás döntő hányadát (74 %) tartalmazta. Ezt a lépést számos más restrikciós endonukleáz tisztításánál is rutinszerűen alkalmazzák, hasonló következmény nélkül. Mivel az ultracentrifugálást a feltárást követő nyers kivonattal végeztük, arra következtettünk, hogy az *CeqI in vivo* nagy tömegű aggregátumot képez.

Valószínűnek látszott az enzim membránasszociáltsága, mivel Triton X-100 (vagy Nonidet P-40) jelenléte a pufferben mind a szedimentációs képet, mind a DEAE cellulóz oszlopról való elúció mintázatát megváltoztatta. Más kísérletek viszont arra utaltak, hogy az enzim nem membránhoz kötött. Egyrészt nem sikerült az CeqI-et liposzómába zárni, másrészt acetonos kicsapás és metanos kloroformos mosás után is lehetséges volt enzimaktivitást detektálni.

5.4. A CeqI endonukleáz reakció optimális körülményei

Az enzim pH 7.5-pH 8 tartományban 100-150 mM NaCl koncentráció mellett működik optimálisan. Magasabb sókoncentrációk (pl. 300 mM KCl) reverzibilisen gátolják az enzimaktivitást, míg alacsonyabb sótartalmú pufferekben főképpen pH 6 alatt az endonukleáz destabilizálódik. Az enzim kofaktoraként mind a Mg^{2+} , mind a Mn^{2+} megfelelő, bár az utóbbi kation sztár aktivitást okoz. Maximális enzimaktivitás 42 °C-on mérhető (3. ábra).

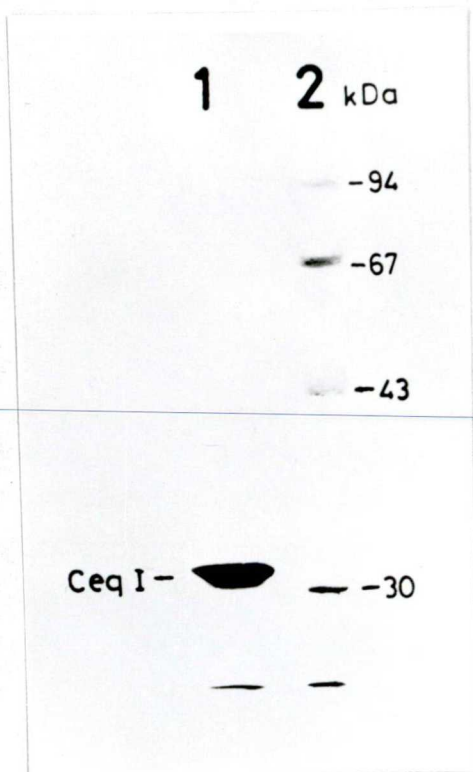


3. ábra

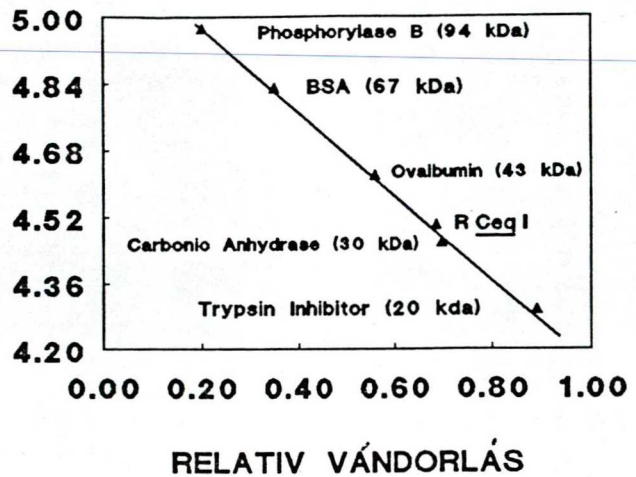
A pH (A), a sókoncentráció (B) és a hőmérséklet (C) hatása a CeqI endonukleáz aktivitására. pH 5-6 között Na-acetát, pH 7-9 között Tris-HCl, pH 9-10 között NaOH-glicin puffereket használtunk.

5.5. Molekulatömeg és molekuláris formák

Homogenitásig tisztított CeqI endonukleáz SDS poliakrilamid gélelektroforézisével nyert adatok alapján az alegység molekulatömegét 32 ± 2 kDa-nak becsültük (4. ábra).



Ig MOLEKULATÖMEG



a

b

4. ábra

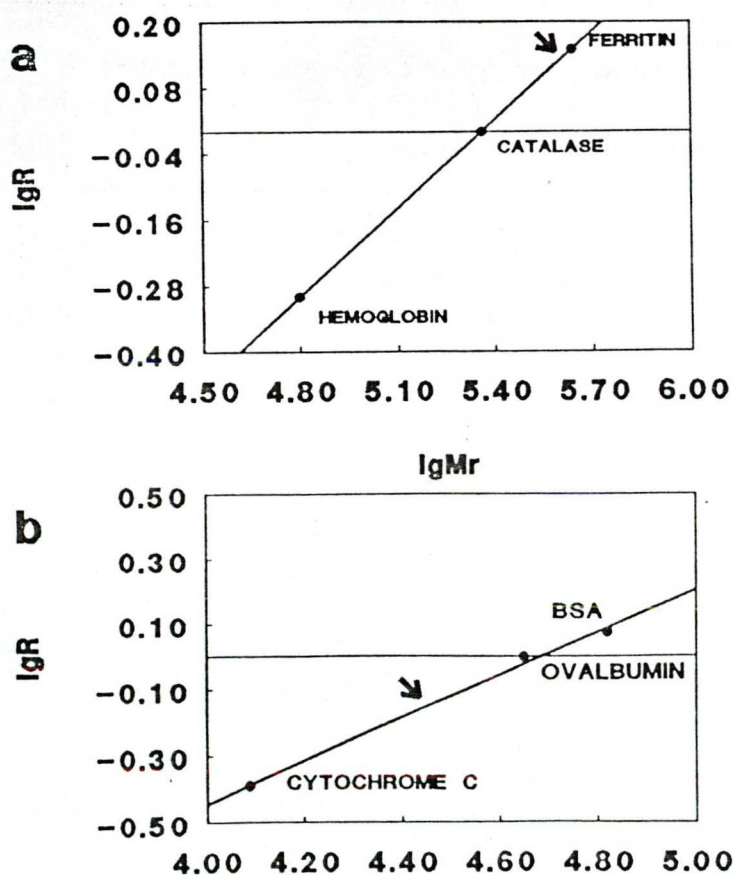
Homogenitásig tisztított R CeqI preparátum (5 μ g) SDS PAGE képe molekulatömeg standard fehérjék mellett (a), és molekulatömegének meghatározása (b).

Hasonló molekulatömeg értéket kaptunk 5-20 %-os lineáris szacharóz grádiens centrifugálással (5./a ábra) és Sephacryl S-300 gélfiltrációs kromatográfiával is, magas ionerősség esetén (1 M KCl) (6. ábra).

A fiziológiához közeli sókoncentrációknál (150-200 mM) a CeqI endonukleáz aktivitását egyaránt a 300 kDa-nál nagyobb molekulatömegnek megfelelő frakciókban találtuk a két utóbbi módszerrel (5./b, 6. ábra).

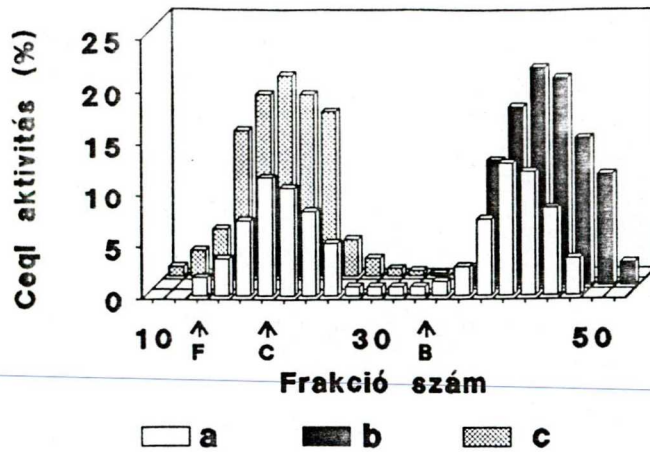
A kb. 300-600 kDa-os komplexek diszaggregálhatóak. Magas sókoncentráció esetén csak a monomernek megfelelő 32 kDa körüli forma volt jelen. Nem-ionos detergenssek (Triton X-100 vagy Nonidet P-40) jelenlétében a nagyméretű komplex és a monomer mellett kisszámú köztes méretű molekulaformát detektáltunk (6. ábra).

DNS-t tartalmazó pufferben végzett gélfiltrációs kromatográfia szintén a komplexek méretének csökkenését mutatta ki (7. ábra).



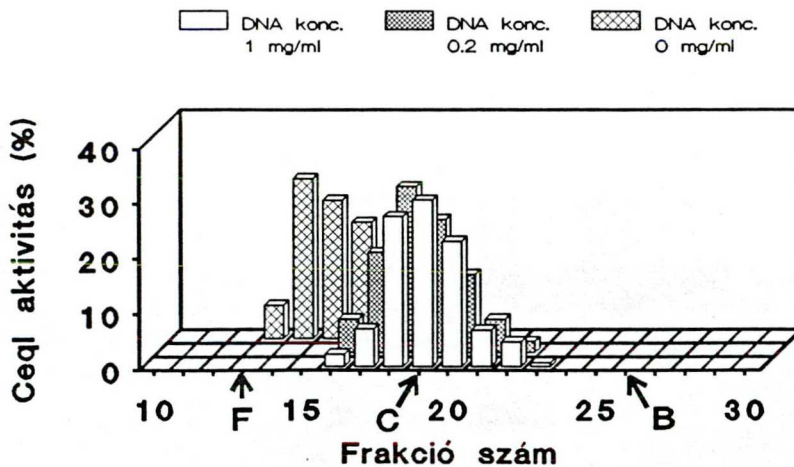
5. ábra

A CeqI endonukleáz molekulatömegének meghatározása lineáris szacharóz grádiens ultracentrifugálással 5-20 %-os grádiensen PC (a) illetve 5-30 %-os grádiensen PC + 1 M NaCl pufferben (b). A nyilak a CeqI aktivitás helyét jelölik.



6. ábra

A CeqI molekulatömegének változása magas sókoncentráció és Triton-X100 detergens hatására. S-300 kromatográfia (a) PC puffer + 1 % Tx-100; (b) PC puffer + 1 M KCl; (c) PC puffer jelenlétében. F -ferritin (440 kDa); C -kataláz (232 kDa); B -bovin szérumalbumin (64 kDa).



7. ábra

A nagyméretű enzimkomplexek diszaggregációja DNS hatására. F = ferritin, C = kataláz, B = bovin szérumalbumin. Az S-300 kromatográfia körülményeinek részletes leírása az Anyag és módszer fejezetben található.

5.6. Gél-retardációs (mobility-shift) kísérletek

Milyen szerkezeti egységhez köthető az enzimaktivitás? A kérdést gél-retardációs elektroforézis kísérletekkel próbáltuk megválaszolni.

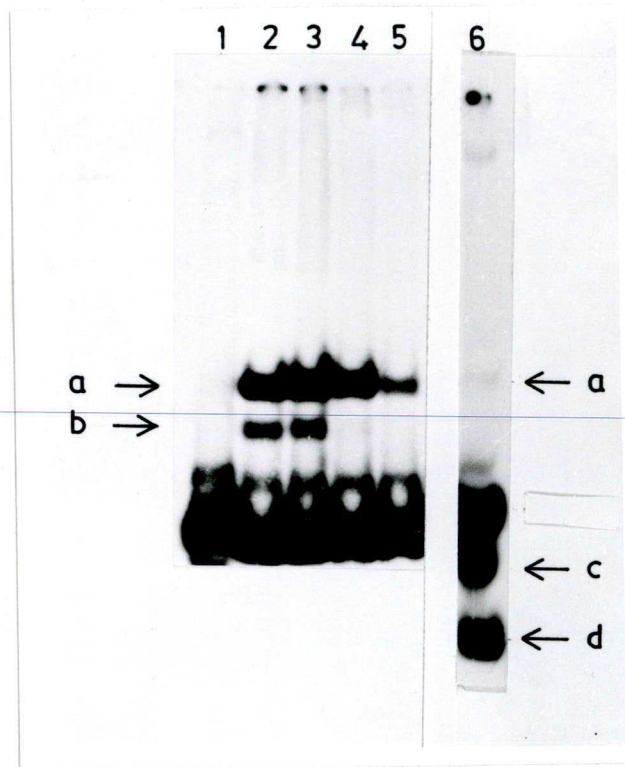
A II-es típusú restrikciós endonukleázok a vágási reakcióhoz valamilyen kétértékű kation kofaktort (általában Mg^{2+} , de lehet Mn^{2+} , Co^{2+}) igényelnek. A kofaktor hiányában a DNS-t (mely egy fehérjekötő helyet tartalmazó radioaktívan jelölt kisebb fragment) ugyan megköti az enzim, de a hasítás nem jön létre, így DNS-endonukleáz komplexek detektálhatók a módszerrel. A komplexek fehérjekomponensének mérete bizonyos feltételek teljesülése mellett Bading módszerével kiszámítható. Megállapítása szerint egy lineáris DNS fragment retardációja arányos a fehérje molekulatömegével (M). Ez az arányosság

$$M = K \cdot (m / 1 - m')$$

képlettel írható le, ahol m a szabad, m' a kötött DNS vándorlási távolsága, K pedig a gél sűrűségétől függő állandó (Bading 1988).

Alacsony ionerősségű kötőpuffer (10 mM NaCl) használata esetén több -DNS-fehérje komplexnek megfelelő- halvány csík volt megfigyelhető, melyek méreteit a monomer méret páros számú többszöröseinek számoltuk a fenti módszert alkalmazva.

Egy felismerőhellyel bíró 61 bp-os DNS fragmentek és CeqI által létrehozott specifikus DNS-fehérje komplexeket mutat a 8. ábra.

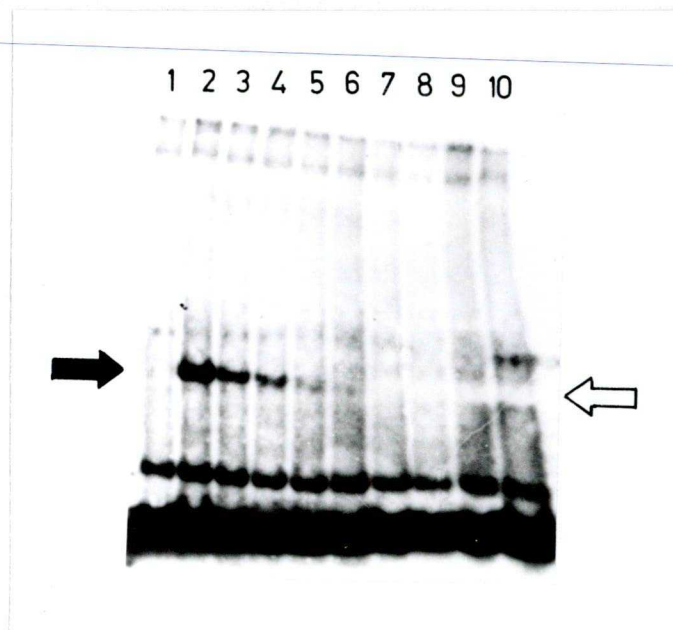


8. ábra

Corynebacterium equi kivonat mobility shift elektroforézis képe. Valamennyi minta 1.35 pmol jelölt 61 bp-os pPC9 fragmentet tartalmazott. A kötési reakció és az elektroforézis paraméterei az Anyag és módszer fejezetben találhatóak. Az 1-3 sávok 0, 1.3, 0.65 pmol nyers kivonatot (CeqI(1)), a 4 és 5 sávok 0.13 és 0.065 pmol részlegesen tisztított (CeqI(2)) kivonatot tartalmaztak. A 6-os sáv kötési reakciója 1 mM Mg^{2+} jelenlétében EDTA nélkül játszódott le.

A két retardált csík (a és b) mérete 130 és 75 kDa-nak adódott a fenti számítással. A 75 kDa-os komplex csak a nyers kivonattal végzett kísérletek esetén volt jelen, tisztított preparátumokat használva viszont sohasem, ezért feltételeztük, hogy fehérjekomponense nem az endonukleáz. Amennyiben a kötési reakciót Mg^{2+} jelenlétében játszottuk le, a kb. 130 kDa-os komplex eltűnt, és helyette 35 és 26 bp-os oligonukleotidoknak megfelelő csíkok (d és e csík) jelentek meg, igazolva, hogy ezen komplex fehérjeösszetevője

az endonukleáz. Amikor közvetlenül az elektroforézis indítása előtt Mg^{2+} ionokat adtunk az egyik mintához, a radioaktív "DNS-kenődésben" a komplexnek megfelelő magasságban rés keletkezett, míg a rés alatt fokozott denzitású "DNS-kenődés" tűnt fel (9. ábra).



9. ábra

A kísérleti körülmények leírása az Anyag és módszer fejezetben található. A kötőpuffer 2.7 pmol jelölt 61 bázispáros fragmentet és csökkenő mennyiségű CeqI(2) preparátumot tartalmazott (1-10 sávok; 0, 3, 1.3, 0.6, 0.3, 0.06, 0.03, 0.01, 0.0065 és 0.03 pmol). A 10-es zsebbe 10 μ l 10 mM $MgCl_2$ -t adtunk az elektroforézis indítása előtt.

A jelenség lehetséges magyarázata, hogy natív gélről lévén szó, az endonukleáz az elektroforézis alatt folyamatosan működött, az elhasított jelölt fragment darabjai a komplexről ledisszociálva gyorsabban vándoroltak, az enzim pedig újabb szubsztrátot köthetett meg.

A kísérletek eredményeit összefoglalva nagyon valószínű, hogy a CeqI endonukleáz DNS kötő és vágó (azaz aktív)

formája a 130 kDa-os (tetramer) forma, és nem a multimer nagy molekulásúlyú alakok. Ez azt is jelenti, hogy a DNS molekuláknak disszociáló hatása van a nagy molekulásúlyú aggregátumokra. A DNS jelenlétében végzett Sephacryl-300 gélfiltrációs kromatográfia eredménye is megerősíti ezt az állítást (7. ábra).

A gél retardációs vizsgálatok alapján megállapítható, hogy Mg^{2+} hiányában a CeqI endonukleáz felismerőhely specifikusan köti a DNS-t. Így ebből a szempontból az EcoRI -és nem az izoskizomer EcoRV- endonukleázhoz hasonlóan viselkedik.

5.7. Kinetikai vizsgálatok

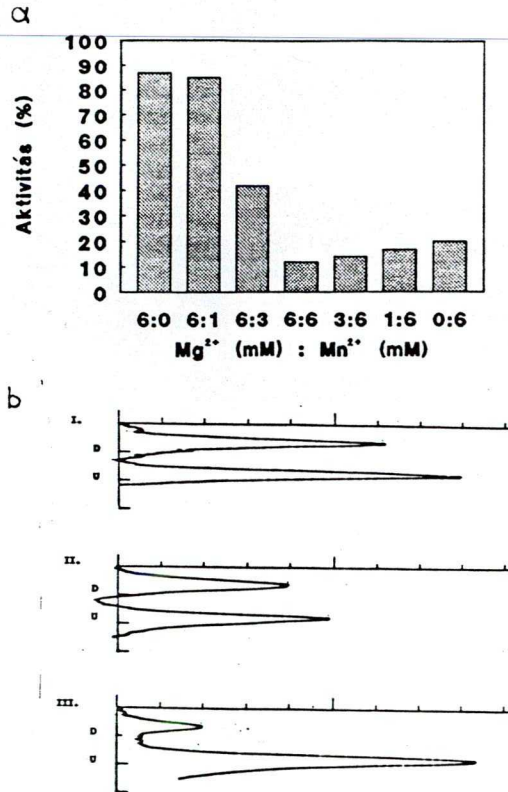
Néhány korai, az enzimműködés vizsgálatára irányuló kísérlet felvetette annak lehetőségét, hogy nemcsak struktúrájában, de működésében is sajátos endonukleázzal állunk szemben.

Az enzim ugyan aktívabb volt Mg^{2+} mint Mn^{2+} ionok jelenlétében, a Mn^{2+} aktivált enzimhez Mg^{2+} ionokat adva a katalitikus aktivitás mégis lecsökkent, ekvimoláris koncentrációknál érve el a minimumot (10/a. ábra).

Az izoskizomer EcoRV aktivitásában nem okozott változást Mn^{2+} hozzáadása a Mg^{2+} ionokkal működő rendszerhez.

Hasonló eredményt kaptunk, ha GTTATC -sztár körülmények között vágóhelynek számító (Izsvák és Duda 1989)- módosított felismerőhellyel bíró decamer oligonukleotidot adtunk

szubsztrátot tartalmazó reakcióelegyhez. A jelölt szubsztráton mérhető enzimaktivitás erősen lecsökkent, míg az *EcoRV* enzimmel végzett paralell kísérletben nem változott szignifikánsan (10/b. ábra).



10. ábra

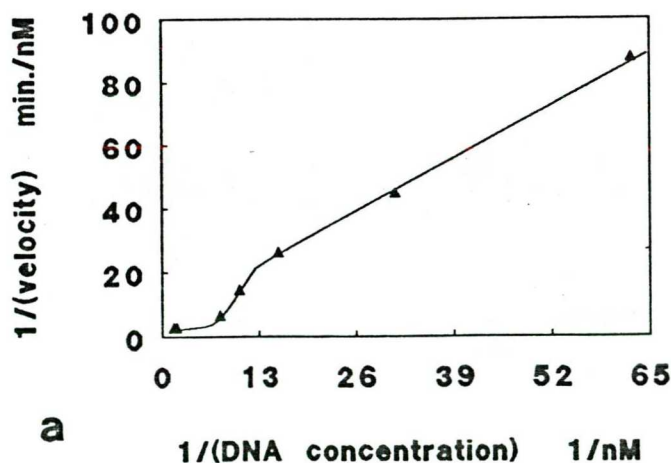
A kétértékű kationok hatása a *CeqI* aktivitására (a).

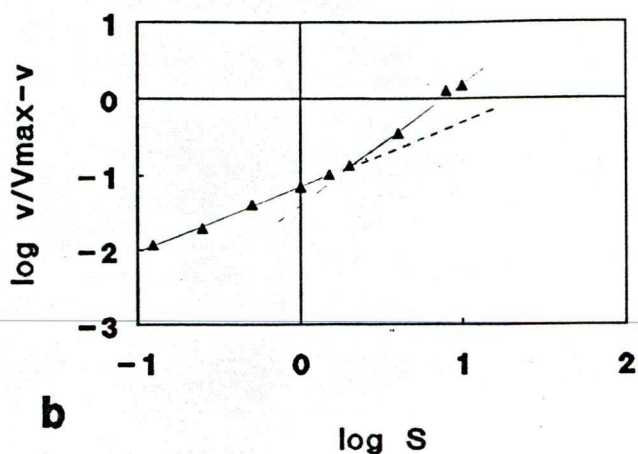
Felismerőhelyet (GATATC) és módosított felismerőhelyet (GTTATC) tartalmazó oligonukleotidok hatása a *CeqI* aktivitására (b). 50 ng pBR322 377 bp-os, egy *CeqI* felismerőhelyet tartalmazó, ³²P jelölt fragmentjét emésztettük 1 U enzimmel (100 sec, 37 °C, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM Mg²⁺), ami körülbelül 90 %-os emésztést eredményezett. A többi mintát hasonló módon kezeltük, a kétértékű kationok mennyiségének változtatása mellett. Az emésztési hatásfok meghatározása az Anyag és módszer fejezetben leírtak szerint történt. A (b) ábra az autoradiogramok "scan"-jét mutatja. A jelölt 377 bp-os fragment részleges emésztése (I), GATATC (II) és GTTATC (III) szekvenciák hatása. D -emésztett, U -emésztetlen fragment radioaktivitása.

Ezen eredmények alapján merült fel az enzímalegységek közötti valamiféle kölcsönhatás lehetősége, mely zavart szenvedhet ha különböző kofaktort vagy szubsztrátot kötnek a rendszer egyes elemei.

Az enzimkinetika típusának tisztázása végett vizsgáltuk a szubsztrátkoncentráció változás hatását a reakció kezdeti sebességére (v versus $[S]$). A 11. ábra a kísérleti eredmények (a) Lineweaver-Burk és (b) Hill féle ábrázolását mutatja.

Mindkét görbe eltérése az egyenestől nem Michaelis-Menten kinetikára utal. A Hill görbe meredeksége a középpont ($v_{\max}/2$) körüli régióban nagyobb mint egy. A kísérleti adatokat számítógép segítségével (Dr Marc Eberhard COSY nevű programját használva) is elemeztük. A gép által számolt $n_H = 1.35 \pm 0.09$ érték pozitív kooperációt jelez, valamint legfeljebb két szubsztrátkötőhely létezésére enged következtetni.





11. ábra

A *CeqI* endonukleáz kinetikai adatainak (a) Lineweaver-Burk- és (b) Hill-görbéje

Az enzimaktivitás mérése az Anyag és Módszer fejezetben leírtak szerint történt.

5.8. A *CeqI* restrikciós-modifikációs rendszer klónozása *E. coli*-ban

A RM *CeqI* gének klónozása a "hungarian trick" módszer alapján történt.

Feltételeztük, hogy a RM *CeqI* géneket (az *EcoRV* génekkel ellentétben) valószínűleg a kromoszómális DNS kódolja, mivel a *Corynebacterium equii*-ből preparált plazmid rezisztenciagénnel ellátva és *E. coli*-ba transzformálva nem mutatott RM aktivitást. A fentiek miatt tehát a *Corynebacterium equii* genomiális DNS-ét *MboI* endonukleázzal részlegesen emésztettük, majd ampicillin rezisztenciát hordozó Lambda-pGY97 fágmid vektor (Vincze és Kiss, 1990)

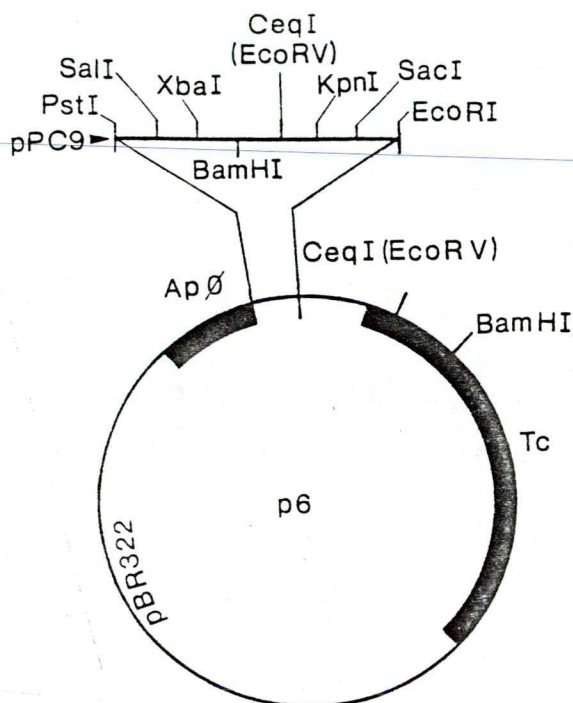
BamHI helyére klónoztuk (Anyagok és módszerek). A ligátumot *in vitro* pakoltuk, majd K-1400 jelű, *E.coli* gazdát fertőztünk. Az így nyert fágmid-klóntárból össz-DNS-t preparáltunk, amit többször egymás után CeqI-el emésztettünk. Az emésztett DNS-t transzformálás segítségével újra K-1400 sejtekbe juttattuk, és ampicillin rezisztenciára szelektáltunk. A klóntár CeqI-el való emésztése feldarabolt minden metilálatlan DNS-t (a lambda-pGY90 vektoron 22 CeqI felismerőhely van), tehát az antibiotikum szelekció után megmaradó klónok metilázt kódolók kellett legyenek.

Az 55 pozitív klón tesztelését többféleképpen végeztük. A rekombináns fágmidokat kontroll DNS jelenlétében is emésztettük CeqI-el, s kizártuk az emésztési reakció hibáját.

A fágmid klónok nagy méretük miatt, plazmid formájukban fenntartva nagyon mutabilisak voltak, egy-egy transzformáció után jelentős méretcsökkenést mutattak, így meg kellett vizsgálnunk azt lehetőséget, hogy a klónozási procedúra során a plazmid deléciós mutációval elvesztette a CeqI felismerőhelyeket, ami hibás pozitív eredményre vezet. A pBR322 plazmid ampicillin-rezisztencia génjének helyére egy CeqI felismerőhelyet tartalmazó pPC9 fragmentet klónoztunk, így annak csak a tetraciklin-rezisztencia génje maradt ép (p6) (12. ábra).

Az így kialakított konstrukciót együtt transzformáltuk a tesztelendő plazmiddal (*E.coli*, JM107), majd ampicillin-tetraciklin kettős szelekciót alkalmaztunk. A

kotranszformált p6 *Bam*HI fragmentje nem volt emészthető *Ceq*I-gyel, ellentétben a kontroll p6 plazmid azonos körülmények között emésztett hasonló fragmentjével, mely teljesen megemésztődött (13. ábra).



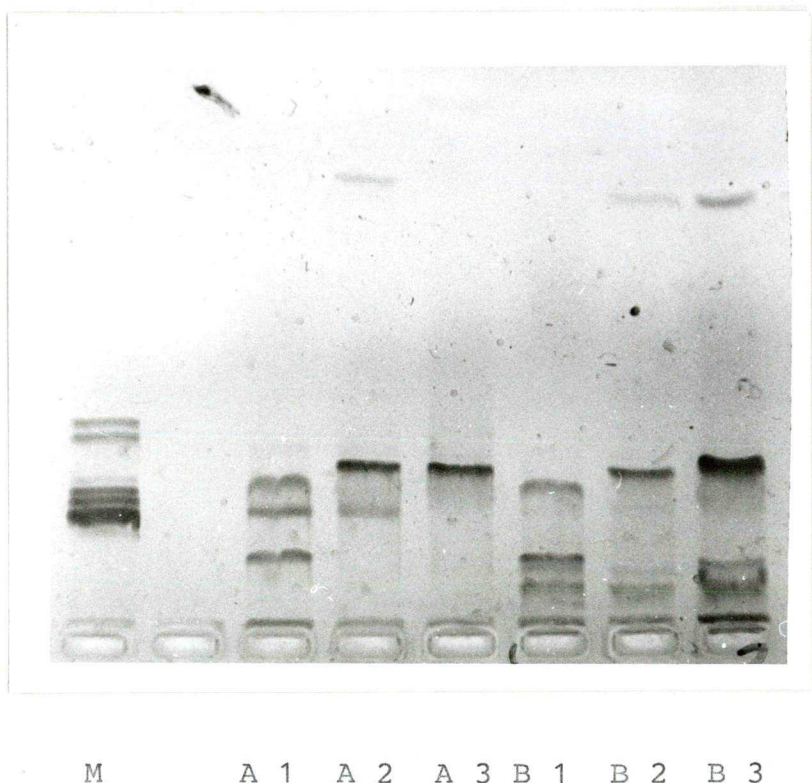
12. ábra

A p6 plazmid restrikciós térképe.

A metiláz pozitív klónokat továbbvizsgáltuk endonukleáz aktivitást keresve.

Egyrészt nyers fehérje kivonatot (crude extract) készítettünk minden egyes esetben, amivel Lambda-DNS-t próbáltunk emészteni. A *Ceq*I eredeti gazdájában, a *Corynebacterium equi*-ben stabil enzim. Nyers fehérje kivonatból jól mérhető, proteázgátlók hiányában sem degradálódik. Ez nem mondható el a klónozott enzimről.

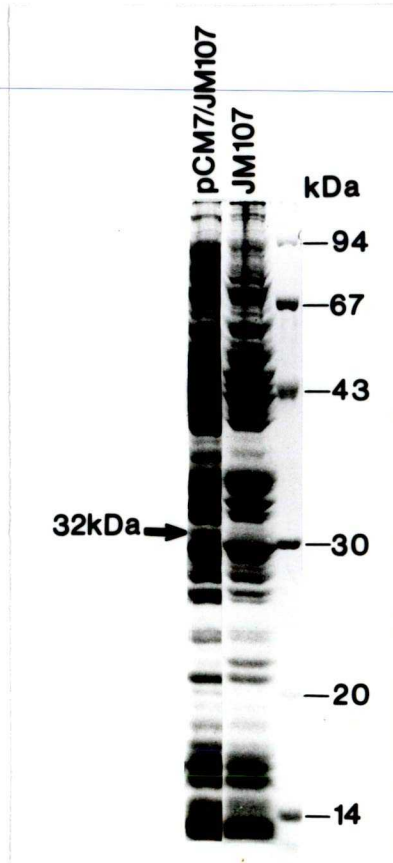
3 klón esetében kaptunk *CeqI* emésztésre emlékeztető mintázatot (pCM4, pCM7, pCM14). Az aktivitást produkáló enzim valószínűleg instabil, mert a specifikus enzimaktivitás a transzformált *E.coli* nyers kivonatának DE52 oszlopon történő tisztítása után már nem volt kimutatható.



13. ábra

A p6 (A) és a p6+pCMR7 (B) plazmidok emésztése. (1) emésztetlen; (2) *Bam*HI; (3) *Bam*HI és *CeqI* emésztés; M *lambda/Hind*III. (A) esetben a kb.400 bp-os p6/*Bam*HI fragment eltűnt, míg (B) esetben megmaradt a kettős emésztés után.

Denaturáló poliakrilamid gélen a pCM7 jelű plazmiddal transzformált *E.coli* nyers fehérjekivonatot (JM107/pCM7) futtatva, a 32 kDa-os mérettartományban extra fehérjecsík található, plazmidot nem tartalmazó kontroll (JM107) mellett (14. ábra).



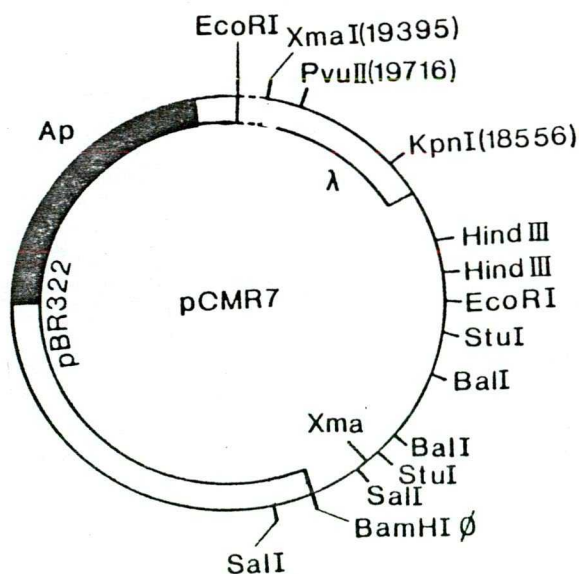
14. ábra

Sok enzim eredeti gazdájából nehezebben illetve kisebb hatásfokkal tisztítható, mint *E.coli*-ből. Vannak azonban olyan esetek is, amikor a helyzet fordított. Ilyenkor vagy az idegen gén kifejeződése gyengébb, vagy a gén termékei gyorsabban degradálódnak. Előfordulhat az is, hogy a klónozás során valamilyen fontos régió lemaradt a génről. Ennek az ellenkezőjét tapasztalták a *DdeI* R-M klónozása során. A teljes metiláz gén terméke volt meglehetősen instabil, míg annak egy csonka változata aktívabbnak és

egyben jóval stabilabbnak is bizonyult (Sznyter és mtsai. 1987).

Vizsgáltuk a klónok fágfertőzéssel szembeni érzékenységét (fágteszt), mivel az RM rendszerek elsősorban a baktérium védekezési mechanizmusában játszanak szerepet. Az endonukleázt expresszáló klónok általában rezisztenciát mutatnak fágfertőzés esetén. A fágteszt endonukleázt kifejező klónok szelektálására önmagában nem alkalmas, mert fágrezisztenciát nem mutató klónok is termelhetnek endonukleázt, de a megfelelő kontrollhoz képest tapasztalt rezisztencia restrikciós enzim jelenlétére utal (Lunnen és mtsai 1988).

A pCM7 jelű klón esetében három nagyságrenddel kevesebb plakkot számoltunk, mint a kontrollon. Ezt a plazmidot tartottuk meg a további kísérletekhez, és pCMR7-nek neveztük el, mivel a metiláz génje mellett a restrikciót is hordozza (15. ábra).



15. ábra

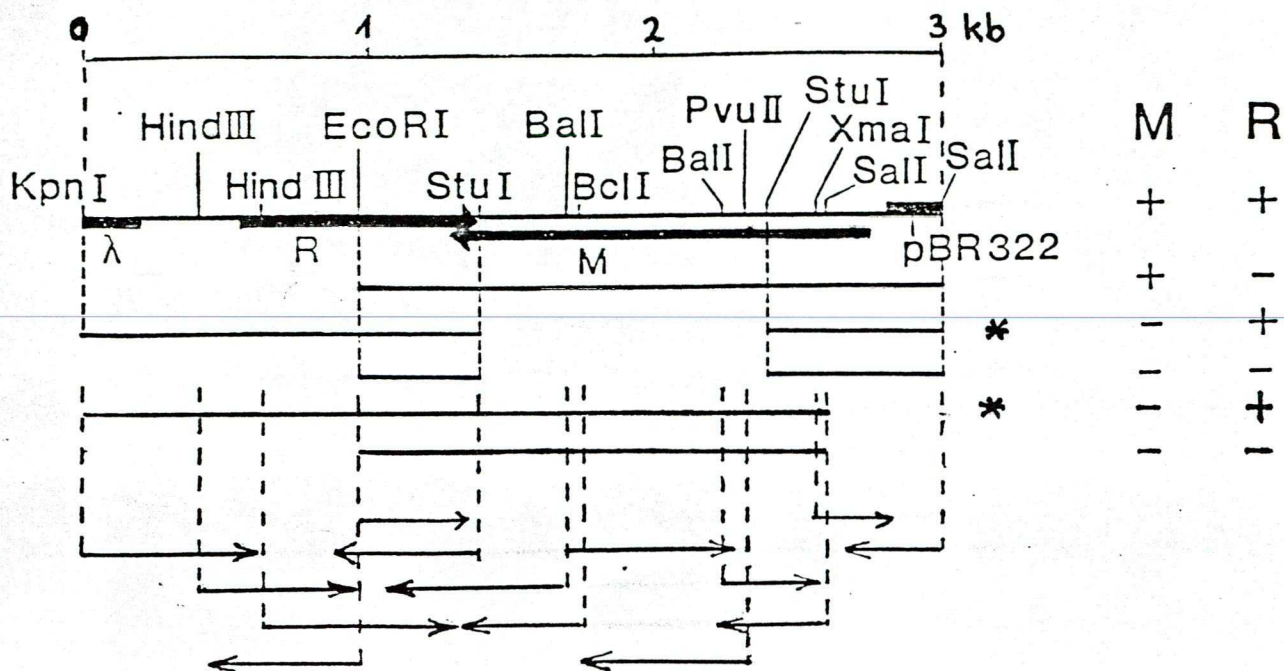
A pCMR7 plazmid szerkezete és restrikciós térképe.

5.9. A CegI RM rendszer génjeinek szekvenálása

A **17. ábra** mutatja a szekvenálási stratégiát, a talált két ORF-et és a két gén egymáshoz viszonyított helyzetének meghatározását. A számítógépes nukleisav (GenBank, EMBL) és protein (SwissProt, PIR) adatbázis keresés (Fasta, Blast programok) megerősítette, hogy eddig ismeretlen szekvenciákról van szó.

Az endonukleáz gén a 286-os nukleotidnál található ATG kodonnal kezdődhet, tőle -12 bázispárra kezdődik az AGAGGG szekvencia, mely megfelel a Gram+ baktériumokra jellemzően erős riboszómakötő helynek (Shine-Dalgarno szekvencia). Az ORF-et kettős terminációs kodon zárja (1196-os nukleotidtól). A gén mérete 810 bp, a lefordított 270 aminosavas fehérje molekulásúlya 31.6 kDa, mely jól egyezik a kísérletes adattal (32 ± 2 kDa). A protein jelentős hidrofób régiókat tartalmaz (pl. 124-164, 185-203 aminosavak), ez magyarázhatja a korábban említett aggregációs hajlamot.

A másik 1551 bázispáros ORF a komplementer szálon az előbbivel ellentétes orientációban található (a két gén 37 nukleotidnyit átfed). A lefordított fehérje 517 aminosavat tartalmaz (kb. 60 kDa). A metiláz méretére nincs kísérletes adatunk. A szekvenciában az adeninmetilázokra jellemző két motívummal homológiát mutató régiókat találtunk (**17. ábra**).



16. ábra

A *CeqI* RM rendszer génjeit hordozó 3 kilobázis nagyságú DNS fragment restrikciós térképe. A gének elhelyezkedésének megállapítása deléciós mutánsok segítségével (M metiláz, R endonukleáz aktivitást jelöl). A nyilak a szekvenált M13 szubklónok elhelyezkedését és irányultságát jelzik. A csillaggal jelzett konstrukciók letális hatásúak.

DPPY motívum

; FXGXG motívum

RVQLSFSC	PPF	IKNR	M	CeqI	;	LIRSP	FSRVG	YGLSD	M	CeqI
SVQLIICD	PPY	NIML	M	RsrI	;	LILD	ASGGY	SVFEC	M	HhaII
SVQLAVID	PPY	NLSK	M	MboII	;	LILDF	FAGSG	TTAHA	M	KpnI
PVDLIIAN	PPY	VRTQ	M	BanIII	;	RYFEP	FVGSG	ALFFD	M	DpnII
IFDGALGN	PPF	IRYQ	M	Eco57I	;	CLVEP	FVGAG	SVFLN		Ecoda
KSDIVVTN	PPF	SLFR	M	EcoRI	;	LVIDP	FCGSG	STLHA	M	EcaI
RDDVVYCD	PPY	IGRH	M	EcoRV	;	VWVEP	FMGTG	VVAFN	M	EcoRV
SIDLIFAD	PPY	FMQT	M	HinfI	;	VVLDP	FFGTG	TTGAV	M	HinfI
PFDAIVSN	PPY	SVKW		HsdM	;	LVLDF	FAGSG	TTAEA	M	EcoP1
RKYNKILN	PPY	LKIA	M	PstI	;	IVLDF	FAGSG	TTAHT	M	EcoP15

17. ábra

A *CeqI* metilázban talált, az adeninmetilázok DPPY és FXGXG motívumaival homológiát mutató régiók, és azok összehasonlítása néhány adeninmetiláz homológ szekvenciáival.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Corynebacterium equi*-ből izolált CeqI restriktációs endonukleáz natív állapotban 12-20 alegységből álló komplexeket alkot, melyek DNS illetve nem-ionos detergens jelenlétében részlegesen szétesnek. Magas sókoncentrációnál (pl. 1 M NaCl) az enzim alegységeire disszociál és elveszti aktivitását.

Mobility shift kísérleteink alapján a négy alegységből álló komplex (tetramer) bizonyult az endonukleáz DNS-t kötő és vágó formájának. Ez a jelenség azért figyelemreméltó, mert az eddig behatóbban tanulmányozott II típusú restriktációs enzimek funkcionális egységeként a dimer alakot írták le, bár egyes esetekben (*EcoRI*, *BamHI*, *Bst1503*) tetramer enzimmolekulák létezését is bizonyították.

Kinetikai vizsgálataink az alegységek között pozitív kooperatív kölcsönhatás létére utalnak.

A fentiek alapján a CeqI működésére a következő hipotézist állítottuk fel:

- 12-20 monomerből álló, inaktív komplexekként tárolódik a sejtben

- DNS hatására aktív tetramerekre disszociál

- egy-egy tetramer egy vagy két palindrom szekvenciát köthet és vághat a szubsztrátkoncentráció függvényében.

- a katalitikus reakció kooperatív módon játszódik le, mely egyfajta szabályozási mechanizmust jelenthet.

A CeqI RM rendszert kódoló géneket sikerült kifejeztetnünk *E.coli*-ban, és meghatároztuk nukleotidsorrendjüket. Az R CeqI aminosavsorrendje nem tartalmaz homológ szakaszokat az eddig közölt endonukleáz szekvenciákkal. Az izoskizomer EcoRV-höz képest erősen hidrofób molekula. A CeqI metilázban kimutathatóak az adenin metilázok jellegzetes motívumai.

IRODALOM JEGYZÉK

- Alves, J., Rüter, T., Geiger, R., Fliess, A., Maass, G.,
Pingoud, A. (1989) *Biochemistry* 28(6):2678-2684
- Anderson, J.E. (1993) *Curr. Opinion in Struct. Biol.* 3:24-30
- Arber W. (1965) *J. Mol. Biol.* 11:247-256
-
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D.,
Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987)
Current Protocols in Mol. Biol.(J. Wiley and
Sons), New York
- Bading, H. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16, 5241-5249
- Balganesh, T. S., Reiners, L., Lauster, R., Noyer-Weidner,
M., Wilke, K. et al. (1987) *EMBO J.* 6:3543-3549
- Barany, F., Slatko, B., Danzitz, M., Cowburn, D.,
Schildkraut, I., Wilson, G.G. (1992) *Gene* 112:91-95
- Behrens, B., Noyer-Weidner, M., Pawlek, W., Lauster, R.,
Balganesh, T. S. (1987) *EMBO J.* 6:1137-1142
- Bickle, T. (1982) *Nucleases* (Linn, S. M., Roberts,
R.G.) 95-100 CHS, New York
- Bougueleret, L., Schwartzstein, M., Tsugita, A. ,Zabeau,
M. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:3654-3676
- de la Campa, A.G., Kale, P., Springhorn, S.S., Lacks, S.A.
1987, *J. Mol. Biol.* 196:457-496
- Catteral, J.F., Welker, N.E. (1977) *J. Bacteriol.*
129:1110-1120
- Cerritelli, S., Springhorn, S. S., Lacks, S. A. (1989) *Proc.*
Natl. Acad. Sci. 86:9223-9227

- Clewell, D.B. (1972) *J. Bacteriol.* 110:667
- Connaughton, J. F., Kaloss, W., Vanek, P., Nardone, G.,
Chirikjian, J.G. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:4002
- Conrad, M., Topal, M.D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
U.S.A. 86:9707-9711
- Dahlquist, F.W. (1978) *Methods in Enzymology*, XLVIII,
270-299
- Danaher, R.J., Stein, D.C. (1990) *Gene*, 496:129-132
- Depew, R.E., Wang, J.C. (1975) *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U.S.A. 72:4275-4279
- Duda, E., Izsvák, Z., Orosz, A. (1987) *Nucleic Acids*
Res. 15:1334
- Eberhard, M. (1990) *CABIOS.* 6:213-211
- Van Etten, J.J., Xia Y., Burbank, D.E. ,. Narva, K.E.
(1988) *Gene* 74:113-115
- Fliess, A., Wolfes, H., Seela, F., Pingoud, A. (1988)
Nucleic Acids. Res. 16(24):11781-11793
- Garnett, J., Halford, S.E. (1988) *Gene* 74(1):73-76
- Gingeras, T.R., Brooks, J.E. (1983) *Proc. Natl. Acad.*
Sci. U.S.A. 80:402-406
- Hedgpeth, J., Goodman, H.M. , Boyer, H.W. (1972) *Proc.*
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69:3448-3452
- Heitman, J. (1992) *BioEssays* 14:445-454
- Heitman, J., Zinder, N.D. , Model, P. (1989) *Proc.*
Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86(7):2281-2285
- Heitman, J. , Model, P. (1990a) *EMBO J.* 9(10):3369-3378
- Hill, C.M., Waight, R.D., Bardsley, W.G. (1977) *Mol.Cell.*

- Biocem. 15:173
- Ish-Horovitz, D. ,. Burke, J.F. (1981) Nucleic Acids
Res. 9:2989
- Ito, H., Sadaoka, A., Kotani, H., Hiraoka, N. ,.
Nakamura, T. (1990) Nucleic Acids Res.
18(13):3903-3911
-
- Izsvák, Zs., Duda, E. (1989) Biochem. J. 258, 301-303
- Izsvák, Zs., Jobbágy, Zs., Duda, E. (1992) Zeitschrift
für Naturforschung 47c, 830-834
- Jobbágy, Zs., Izsvák, Zs. Duda E. (1992) Biochem. J.
286. 85-88
- Johannssen, W., Schutte, H., Mayer, H. (1979) J. Mol.
Biol. 133:707-726
- Kapfer, W., Walter, J., Trautner, T. (1991) Nucleic Acids
Res. 19:6457-6463
- King, K., Benkovic, S.J. ,. Modrich, P. (1989) J. Biol.
Chem. 264:11807-11815
- Kim, Y., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J. ,.
Rosenberg, J.M. (1990) Science 249:1307-1309
- Kiss, A., Posfai, G., Keller, C.C., Venetianer, P, Roberts,
R.J. (1985) X02988, Nucleic Acids Res. 13:6403-6421
- Koncz, C., Kiss, A., Venetianer, P. (1978) Eur. J. Biochem.
89:523-529
- Lacks, S., Greengerg, B. (1977) J. Mol. Biol. 114:153-168
- Lal, D., Som, S., Friedman, S., (1988) Mutation
Research 193(3):229-236
- Li, L., Wu, L.P., Chandrasegaran, S. (1992) Proc. Natl.

Acad. Sci. U.S.A. 89:4275-4279

Lunnen, K.D., Barsomian, J.M., Camp, R.R., Card, C.O.,
Chen, S., Croft, R., Looney, M.C., Meda, M.M., Moran,
Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New
York

Marinus, M. G. (1987) Annu. Rev. Genet. 21:113-131

Martin, R.G., Ames, B.N., (1961) J. Biol. Chem. 236:1372-
1379

Matvienko, N.N., Kramarov, V.M., Ivanov, L.Y., Matvienko,
N.I. (1992) Nucleic Acids Res. 20:1803

Mazzarelli, J., Scholtissek, S., . McLaughlin, L.W.
(1989) Biochemistry 28(11):4616-4622

Modrich, P., Zabel, D. (1976) J. Biol. Chem. 251:5866-
5874

Modrich, P., Roberts, R.J. (1982) Nucleases (Linn,
S.M., Roberts, R.J.) 109-154 Cold Spring Harbor
Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Needels, M.C., Fried, S.R., Love, R., Rosenberg, J.M.,
Boyer, H.W. , Greene, P.J. (1989) Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 86:3579-3583

Neet, K.E. (1980) Methods in Enzymology 64:139-157

Newman, P.C., Williams, M.D., Cosstick, R., Seela, F. ,.
Connolly, B.A. (1990) Biochemistry 29:9902-9910

Oelgeschlager, T., Geiger, R., Ruter, T., Alves, J.,
Fliess, A. ,. Pingoud, A. (1990) Gene 89(1):19-27

- Pein, C-D., Reuter, M., Meisel, A., Cech, D., Krüger, D.H.
(1992) *Nucleic Acids Res.* 19:5139-5142
- Petrusyte, M., Bitinaite, J., Menkevicius, S.,
Klimasauskas, S., Butkus, V., Janulaitis, A. (1988)
Gene 74:89-91
- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal,
R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W.J.,
Elhai, J., Hanahan, D. (1988) *Nucleic Acids Res.*
16:1563-1575
- Roberts, R.J., Macelis, D. (1992) *Nucleic Acids Res.*
20:2167-2180
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular
cloning, a laboratory manual* (1989) Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New
York
- Scalenghe, (1981) *Chromosoma* 82:205-216
- Slatko, B.E., Benner, J.S., Jager-Quinton, T., Moran,
L.S., Simcox, T.G., Van Cott, E.M. és Wilson, G.G.
(1987) *Nucleic Acids Res.* 15:9781-9796
- Smith, H.O., Wilcox, K.W. (1970) *J. Mol. Biol.* 51:379-391
- Smith, L.A., Chirikjian, J.G. (1979) *J. Biol. Chem.*
254:1003-1006
- Stephenson, F.H., Ballard, B.T., Boyer, H.W., Rosenberg,
J.M., Greene, P.J. (1989) *Gene* 85:1-13
- Stoeber, T., Koehler, E., Fagin, U., Wende, W., Wolfes, H.,
Pingoud, A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268(12):8645-8650
- Studier, F.W., Bandyopadhyay, P.K. (1988) *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:4677-6481
- Szilák, L., Kiss, A., Venetianer, P. (1990) Nucleic. Acids Res. 18:4659-4664
- Sznyter, L.A., Slatko, B., Mora, L., O'Donnel, K.H. ,.
Brooks, J.E. (1987) Nucleic Acids Res.15(20):8247-8266
- Szomolányi, É., Kiss, A., Venetianer, P. (1980) Gene 10:219-225
- Szybalsky, W., Kim, S.C., Hasan, N., Podhajska, A.J. (1991) Gene 100:13-26
- Taylor, J.D., Goodall, A.J., Vermote, C.L. , Halford, S.E. (1990) Biochemistry 29:10727-10733
- Taylor, J.D., Badcoe, I.G., Clarke, A.R. , Halford, S.E. (1991), Biochemistry 30(36):8743-8753
- Thielking, V., Selent, U., Kohler, R.E., Landgraf, A., Wolfes, H., Alves, J., Pingoud, A. (1992) Biochemistry 31:3727-3732
- Trautner, T. A., Balganesch, T. S., Pawlek, W. (1988) Nucleic Acids Res. 16:6649-6658
- Vermote, C.L.M., Halford S.E. (1992a) Biochemistry 31:6082-6089
- Vermote, C.L.M., Vipond, I.B., Halford S.E. (1992b) Biochemistry 31:6089-6097
- Vincze, É., Kiss, G.B. (1990) Gene 96:17-22
- Wilson, G.G. (1988) Gene 74:281-289
- Wilson, G.G., Murray, N.E. (1991) Ann. Rev. Genet. 25:585-627

- Winkler, F.K., D'Arcy, A., Blocker, H., Frank, R. ,. van Boom, J.H. (1991) J. Mol. Biol. 217(2):235-238
- Winkler, F.K., Banner, D.W., Oefner, C., Tsernoglou, D., Brown, R.S., Heathman, S.P., Bryan, R.K., Martin, Ph.D., Petratos, K., Wilson, K.D. (1993) The EMBO J. 12:1781-1795
- Wolfes, H., Fliess, A., Winkler, F. ,. Pingoud, A. (1986) Eur. J. Biochem. 159(2):267-273
- Woodbury, C.P., Downey, R.L., von Hippel, P.H. (1980a) J. Biol. Chem. 255:11526-11533
- Woodbury, C.P., Hagenbuchle, O., von Hippel, P.H. (1980b) J. Biol. Chem. 255:11534-11546
- Xu, S.Y. ,. Schildkraut, I. (1991) J. Bacteriol. 173(16):5030-5035
- Xu, G-L. Kapfer, W., Walter, J., Trautner, T.A. (1992) Nucleic Acids Res. 20:6517-6523
- Yuan, R. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50:285-315
- Zebala, J.A., Choi, J., Barany, F. (1992) The Journal of Biological Chemistry 267:8097-8105



Függelék

A CeqI RM rendszer génjeit tartalmazó DNS fragment szekvenciája és az endonukleáz génről lefordított aminosavsorrend. A dőlt betűs fehérjerégiók hidrofób jellegűek. SD a feltételezett Shine-Dalgarno szekvenciát jelöli.

ATTGCGTAACCAGCTCACCTGGAGAATCGTGCCATGTAGCACCTTCGTTT	50
AATAGATCCTCTGCCTTCGATTTTGTGCGGCTATAGACATGTACTCGGTA	100
TCCCGAACGCAATAAATTGTGGGCCATGCTTTTCCCATAACTCCCGTCC	150
CGATAAAACCGATTGTAAGATCCCGTTCTTTCAAAAGCCCCAACTCCTTTC	200
CTGTGTTAGCCT AAGCTT ACGACCATAACCAACGGCTTAAACAGACAAT	250
TCTTGAGATTTTCCTTTTATTT CAGAGGGT TCCAGAATGAGAACAAAAAAT	300
	5
GTCTGCACGTTTTCAGTTGATTCTTTTTCCTAAAGTTAGATCGTACATCCC	350
V C T F Q L I L F P K V R S Y I P	22
ATTGCCGCTCATTTTAAAAAGGATTGAGATCACCAAAAATTGTATATCAA	400
L P L I L K R I E I T K N C I S T	39
CAAGAGGTGAGACAACAAAAACATCGGTACGGAG AAGCTT TCGGAAGAA	450
R G E T T K T S V T E K L S E E	55
AAAACGGTCGTTGTAGAGCCAGTCTTCGGATTCCTAAAGGCTCACTTTCA	500
K T V V V E P V F G F L K A H F H	72
TTCCACTCGGTTCTCCGAAGAGGCAACGAAAAGGCGAAAAAGAAAATGGG	550
S T R F S E E A T K R R K R K W A	89
CCCTCCTGGTGGTAATCCTTCGAAAGTATACCGCCAGAAACAGTAAACAA	600
L L V V I L R K Y T A R N S K Q	105
AAGAGAACCAAAAAAAGTAGACAAAAAGGAGTCCGCTCGTCGTTTATTGA	650
K R T K K T R Q K G V R S S F I D	122

TGAGCGGACTCCTTTTTTCATTTATTTTTTGGCTGGTTTTGTTTCGGCCTC	700
E R T P F S F I F W L V L F R P L	139
TTTTTAATGTTTTACCTTGTTCTGCCCAGTCTCTTTTTGTACAAG GAATTC	750
F N V L P C S A Q S L F V Q E F	155
TTCATTACGTCGCCGTGCCTGGTTTGTCTGCATTTCCACTGGAACAGAA	800
F I T S P C L V C P A F P L E Q N	172
CGTTTCTGCTTTTGCTCCATCCACAAACGGAACAAAAACAAAGCAGATGA	850
V S A F A P S T N G T K T K Q M I	189
TTACGATTACACCAATGATTCGTTTCATTGTTGTTTCAGCTCCTGACCCTA	900
T I T P M I R F I V V Q L L T L	205
AGATTTTCATATCGTACGGTTAAAGGAATTTCTCCGTTACGTCGCCGTGC	950
R F S Y R T V K G I S P L R R R A	222
CTGGTTTTTCTTGTGGTTCAATCGGAGTAAATGTTTCTGCGTTGGCTCCA	1000
W F F L W F N R S K C F C V G S I	239
TCCACAAACGGAACAAAAATAAAGCAGACAAGCAATACCAAACGGAATAT	1050
H K R N K N K A D K Q Y Q T E Y	255
TCGTTTCATTGCTGTTCAACTCCTATCATTTTCATATTAGTACGGTAATG	1100
S F H C C S T P I I F I L V R	270
AAGCGCTTCTTTCATGTAATAAA AGGCCT TTTCAAGCAACGATTGTTGTT	1150
TATAGTATTCAAGCAATCTCTTCTGCTAGTTCTGAATACTCAGTGTAATAAT	1200
TCTCGCTCCAACAGTCGTTGCAACTCACTTGTAAGTCGCTCGTCCCTCCC	1250
TTCGTTTATGTACAATGCTTCCGTGATGGCACAGCGTACCATAATTCTT	1300
CGAGATGAATGGCTGTCGCTCCTGCTTTTGCTTCTTGTAACAAACGAATT	1350
GCTTCTGCATTGTTGGCATTCTGGCGCAAGCGAACAT TGGCCA AGTTAGC	1400
CTTTGTTTTAAGTCCTTCTACACTTTTAGAAT TGATC ACCAATCGTTAGCG	1450
CTTCAGCAAATAACATTTCCGCTTCATATAATTTTCTTTGGCGGACACGA	1500
TTAAGCCCTAATGCCCTTAACAGAAGAGCGTGCCTCGTTGGATAAGGCGT	1550

	V	V	V	V	V	
TGCGTCAGCAAGTGCCGATTGGTACTCTTTTTCAGCCTCATCAAACAGAT						1600
	V	V	V	V	V	
TCAGTTCTGTTTTTATAGCTGCTAAAAGCAACCTACAATTTAAAATCGTC						1650
	V	V	V	V	V	
CAAATAAAATTGTTGTTCTCAAACAAATCAATTGCCTGTTCAAGATAAGA						1700
	V	V	V	V	V	
GACAGCAAATGTATATTGGTGATGCGCAAATAACTTTCTCCTAAACGGA						1750
	V	V	V	V	V	
AATAAAATTTCGGCTTTCTCTGATTGATCGTGAACGTGGTCAATTTTCTGT						1800
	V	V	V	V	V	
TCAGCGATCTTATATAGACGAAGCGCTGATTGATACCGCCCTTCATAAAA						1850
	V	V	V	V	V	
CTCATATTGCCCCTCATAAAAATAATATAGAAACGCTAACAACCATCAT						1900
	V	V	V	V	V	
AAATCGTATCCTCTACATTAACAGCCTGGAGGCTCGTTGGTTCAACCCTT						1950
	V	V	V	V	V	
TTTTGTTGCACATCTTCTGTTAGTAGTTGATGGCGAAACAAAACAAGCGA						2000
	V	V	V	V	V	
GTAATAGGACAACACTTTTTCTGTCGGATCTTTCAAGCTGATTGACCAATT						2050
<i>BalI</i>	V	V	V	V	V	
GGCCA ATTTCTGTTTATATTCTTCTGCTTGTTC AACCTCACGAGAGACG						2100
<i>PvuII</i>	V	V	V	V	V	
ATAC AGCTG TACCATTCAACAATTTTTGCGCCCAATTTTTCAGGTGAAAT						2150
	V	V	V	V	V	
AGAAGAAGCCATAGGCACCAACCTTTCGGAAGTAATTGGTAACTTATCCT						2200
	V	V	V	V	V	
GATTATATCCAAGCATTTTAAAAATGTATATCATGTTGCTGTTTTCCCAA						2250
	V	V	<i>StuI</i>	V	V	
CATGCGAAAAATTTGATACCCAC AGGCCT AACAATGAACTACTATTAAC						2300
	V	V	V	V	V	
GTCCGATAGGCCATAGCCGACTCTACTAAAAGGAGAACGAATCAAGTAAA						2350
	V	V	V	V	V	
ATTGGAATTGTCTATTTTTTATGAATGGAGGGCATGAAAATGAAAGTTGG						2400
	V	V	V	V	V	
ACCCGCCACCCCGTGCAGCGAGTGGACCGCCCGTGAGGTGCTCGCCACG						2450
	V	<i>XmaI</i>	V	V	V	
TCGTGGACGAGCAGATGTGGGT CCCGGG ACTGTTGGCCGGAGGAACG GTC						2500
<i>SalI</i>	V	V	V	V	V	
GACG AGGTCGGCCGGGGACCTCGAGGCAGCCGCTCCGTCGGCTCAACCGG						2550
	V	V	V	V	V	
GGCCAGCGGCCCCGACCTCGTGGCCTACTGGCACACCCTGCGGAACTGGT						2600
	V	V	V	V	V	
CACCACCATCGCCTTGCTCGCCCATCCAGGCGCCAGGCCACGTTCTGGC						2650
	V	<i>MboI</i>				
GGAAGTGTTTCGACGAT GATC						2670

[illegible]

<i>BalI</i>	V	V	V	V	
AAAT TGGCCA ATTGGTCAATCAGCTTGAAAGATCCGACGAAAAAGTGTTG	661				
I G Q L V N Q L E R S D E K V L	200				
V	V	V	V	V	
TCCTATTACTCGCTTGTTTTGTTTCGCCATCAACTACTAACAGAAGATGT	711				
S Y Y S L V L F R H Q L L T E D V	217				
V	V	V	V	V	
GCAACAAAAAAGGGTTGAACCAACGAGCCTCCAGGCTGTTAATGTAGAGG	761				
Q Q K R V E P T S L Q A V N V E D	234				
V	V	V	V	V	
ATACGATTTTATGATGGTTTGTAGCGTTTCTATATTATTTTATGAGTGGG	811				
T I Y D G L L A F L Y Y F M S G	250				
V	V	V	V	V	
CAATATGAGTTTTATGAAGGGCGGTATCAATCAGCGCTTCGTCTATATAA	861				
Q Y E F Y E G R Y Q S A L R L Y K	267				
V	V	V	V	V	
GATCGCTGAACAGAAAATTGACCACGTTACGATCAATCAGAGAAAGCCG	911				
I A E Q K I D H V H D Q S E K A E	284				
V	V	V	V	V	
AATTTTATTTCCGTTTAGGAGAAAGTTATTTTGCGCATCACCAATATACA	961				
F Y F R L G E S Y F A H H Q Y T	300				
V	V	V	V	V	
TTTGCTGTCTCTTATCTTGAACAGGCAATTGATTTGTTTGAGAACAACAA	1011				
F A V S Y L E Q A I D L F E N N N	317				
V	V	V	V	V	
TTTTATTTGGACGATTTTAAATTGTAGGTTGCTTTTAGCAGCTATAAAAA	1061				
F I W T I L N C R L L L A A I K T	334				
V	V	V	V	V	
CAGAACTGAATCTGTTTGATGAGGCTGAAAAAGAGTACCAATCGGCACTT	1111				
E L N L F D E A E K E Y Q S A L	350				
V	V	V	V	V	
GCTGACGCAACGCCTTATCCAACGACGCACGCTCTTCTGTTAAGGGCATT	1161				
A D A T P Y P T T H A L L L R A L	367				
V	V	V	V	V	
AGGGCTTAATCGTGTCCGCCAAAGAAAATTATATGAAGCGGAAATGTATT	1211				
G L N R V R Q R K L Y E A E M Y F	384				
V	V	<i>BclI</i>	V	V	
TTGCTGAAGCGCTAACGATTGG TGATCA TTCTAAAAGTGTAGAAGGACTT	1261				
A E A L T I G D H S K S V E G L	400				

V *BalI* V V V
 AAAACAAAGGCTAACT**TGGCCA**ATGTTTCGCTTGCGCCAGAATGCCAACAA 1311
 K T K A N L A N V R L R Q N A N N 417

V V V V V
 TGCAGAAGCAATTCGTTTGTACAGAAGCAAAAGCAGGAGCGACAGCCA 1361
 A E A I R L L Q E A K A G A T A I 434

V V V V V
 TTCATCTCGAAGAATGTATGGTACGCTGTGCCATCACGGAAGCATTGTAC 1411
 H L E E C M V R C A I T E A L Y 450

V V V V V
 ATAAACGAAGGGAGGGACGAGCGACTTACAAGTGAGTTGCAACGACTGTT 1461
 I N E G R D E R L T S E L Q R L L 467

V V V V V
 GGAGCGAGAATTTTACACTGAGTATTCAGAACTAGCAGAAGAGATTGCTG 1511
 E R E F Y T E Y S E L A E E I A E 484

V V *v StuI* V V
 AATACTATAACAACAATCGTTGCTTGAAA**AGGCCT**TTTATTACATGAAA 1561
 Y Y K Q Q S L L E K A F Y Y M K 500
 X <== az endonukleáz gén vége

V AAT V V V
 GAAGCGCTTCATTACCGTACTAATATGAAAATGATAGGAGTTGAACAGCA 1611
 E A L H Y R T N M K M I G V E Q Q 517

X V V V V V
 ATGAAACGAATATTCCGTTTGGTATTGCTTGTCTGCTTTATTTTGTTC 1661
 V V V V V
 GTTTGTGGATGGAGCCAACGCAGAAACATTTACTCCGATTGAACCACAAG 1711

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetet mondok Dr. Duda Ernőnek a szakmai irányításért és segítségért, valamint a dolgozat elkészítésének lehetőségéért.

Köszönöm Dr. Izsvák Zsuzsának és Takács Imrének, hogy tanácsaival és munkájával nagymértékben hozzájárult a dolgozat anyagának összegyűjtéséhez.

Dr. Szilák Lászlónak köszönet az oligonukleotidok elkészítéséért, valamint Finta Csabának a kézirat kritikus elolvasásáért.

Fejes Máriának és Huszár Gyöngyinek köszönöm az értékes technikai segítséget.

Végül köszönet mindazon kollégáimnak, akik valamilyen módon segítségemre voltak.