

Egy cisztron funkcióelemzése genetikai úton

Egyetemi doktori dolgozat

Készítette: Dudás Brigitta

József Attila Tudományegyetem

Genetikai Tanszéki Csoport

S z e g e d

1978



1. Bevezetés	1. oldal
1.1. A lizogén állapot kialakulása	2. "
1.2. A lizogén állapot fenntartása	4. "
1.3. A lizogén állapot megszüntetése	5. "
2. A lizogén baktérium immunitása	6. "
3. A λ fág regulátor génje és a represszor fehérje	6. "
3.1. A regulátor gén /CI gén/	7. "
3.1.1. A represszor fehérje struktur génje	7. "
3.1.2. Az operátor gén	8. "
3.1.3. A promoter gén	8. "
3.2. A λ fág represszor fehérjéje	9. "
4. A Rhizobium meliloti 16-3 fág jellemzése	10. "
5. Célkitűzések	12. "
6. Anyagok és módszerek	13. "
7. Eredmények	20. "
7.1. Hővel indukálható mutánsok fenotipusos jellemzése	20. "
7.2. A mutánsok hőindukciójának vizsgálata	23. "
7.3. A mutációk térképhelyzetének megállapítása	24. "
7.4. Génen belüli szupresszió	32. "
7.5. A λ mutánsok immunitásának vizsgálata	34. "
7.6. A 36 fág λ mutánsainak komplementációs vizsgálata	39. "
8. Eredmények megbeszélése és következtetések	44. "
9. Összefoglalás	48. "



10. Irodalomjegyzék	50. oldal
11. Rövidítések	55. "
Köszönetnyilvánítás	56. "

I. Bevezetés

Az utóbbi évek egyik kiemelkedően fontos kutatási területe az életfolyamatok szabályozása, azok térbeli és időbeli összerendezettségének megvalósulása. A molekuláris biológia, elsősorban a genetika, rendelkezik azzal a lehetőséggel, hogy ezeket a folyamatokat a szabályozási programot hordozó anyag, a DNS szintjén vizsgálja. Hiszen igen nagy felbontóképességgel rendelkező tudományág, amely egyrészt igen ritka 10^{-6} - 10^{-8} -as gyakorisággal bekövetkező események in vivo regisztrálására képes, másrészt a felbontóképessége egyetlen bázispár megváltozására terjed ki. A génműködés szabályozásával foglalkozó első elmélet a Jacob és Monod nevéhez fűződő operon elmélet volt, amely az *Escherichia coli* baktérium tejcukorbontó enzimeit működésének és szabályozásának kérdését tisztázta. Még ma is a lac operon az élővilág egyik legjobban ismert szabályozási egysége /4,19,39/.

Az *E. coli* λ fág felépítése, fejlődése és életciklusa egyike a legtöbbet tanulmányozottaknak és legjobban ismerteknek. A λ fág a mérsékelt /temperált/ bakteriofágok csoportjába tartozik, ami azt jelenti, hogy a fertőzés után a fágnek két lehetséges életutja van:

1./ Litikus ut: A bekerült fág DNS replikálódik, megszintetizálódnak a fágfehérjék, majd a fág részek összeállása után a baktériumsejt a lizozim hatására feloldódik és az utódfágok kiszabadulnak.

2./ Lizogén ut: A fág DNS beépül a baktérium kromoszómába és azzal együtt replikálódik. A lizogén baktérium-

sejtben a fággenom jelenlétére csak a lizogén sejtek immunitása és indukálhatósága utal; illetve néhány baktérium esetében a lizogén konverzió jelensége. A lizogén baktériumsejtben található, annak DNS-ével reciprok rekombináció során összekapcsolódott represszált állapotban lévő fággenomot nevezünk profágnak.

Szenzitív baktériumnak temperált fággal való fertőzésekör előre nem meghatározható az, hogy a litikus vagy a lizogén út játszódik-e le, mert ez két egymással ellentétes folyamat egyensúlyától függ, amit befolyásolnak mind a fertőzés körülményei, mind a baktérium és a fág genotípusa, illetve a baktériumsejtek "fiziológiai állapota" is /12/.

A mérsékelt fágok közül az E.coli λ fág lizogén állapotának szabályozási rendszere a legrészletesebben tanulmányozott és a legjobban ismert folyamat. Lizogén állapot esetén három "részfolyamat"-ról érdemes beszélnünk:

- 1./ A lizogén állapot kialakulása
- 2./ A lizogén állapot fenntartása
- 3./ A lizogén állapot megszűnése

1.1. A lizogén állapot kialakulása

A lizogén állapot kialakulásához tulajdonképpen szintén két lépés szükséges, az egyik a fággenom integrálódása a baktériumkromoszómába /int gén/ /2/, a másik pedig a

represszor fehérje szintézisének megindulása /10/.

Nem lizogén baktériumsejt fertőzésekor a CI regulátorgén transzkripciója a pre /promoter for repressor establishment / promotertől indul, de a megfelelő sebességű transzkripcióhoz a CII és CIII gének termékére /8/ is szükség van /pozitív kontroll/. A pre transzkripcióval 200-300 lesz a sejtenkénti represszorok száma.

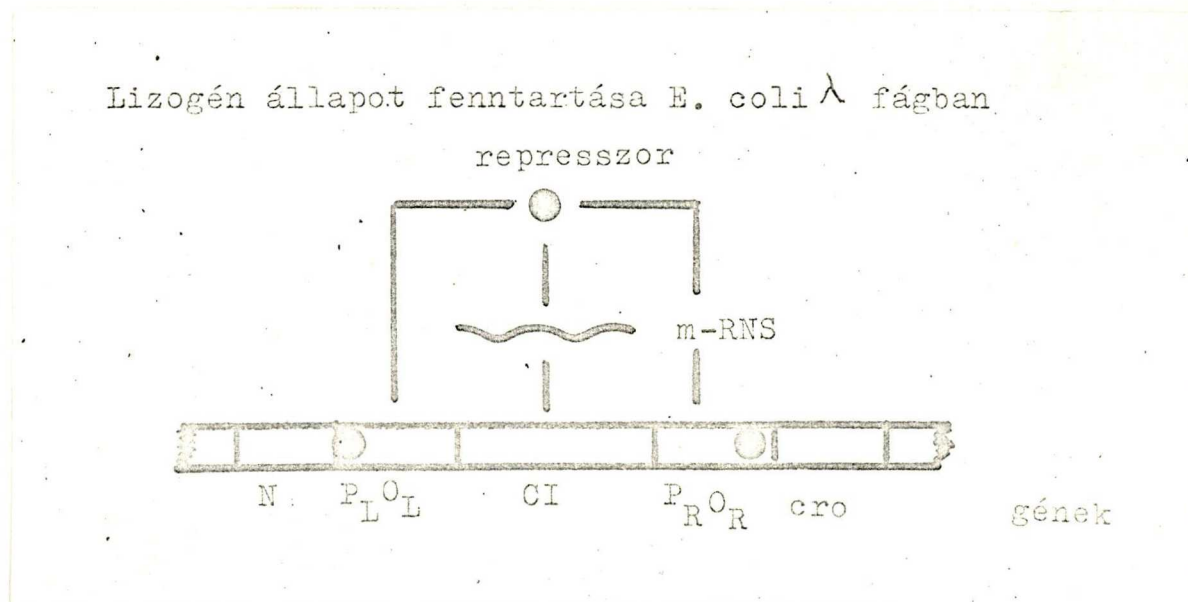
A cro gén ebben a folyamatban negatív szabályozóként szerepel - gátolja CI működését /13,14/.

A N gén viszont pozitív szabályozó szerepet tölt be a korai gének működésében, tehát a lizogén állapot nem alakul ki, ugyanis közömbösíti a baktérium ϕ -faktorát, antiterminátorként szerepel, jelenlétében mind a bal, mind a jobb irányú transzkripció tovább folyik.

Bizonyos vizsgálatok szerint a p_o promotertől kiinduló RNS szintézis kettős szerepű: első esetben egy 81 bázis-párnyi un. oopRNS szintetizálódik, amely a DNS replikációban "primer"-ként szerepel és a fág litikus ciklusba való belépését eredményezi. De különleges körülmények között az RNS szintézis nem áll le, hanem tovább folytatódik és így a cro-n, CII-n és CIII-n keresztül mintegy "átvezeti" a fág genomot a lizogén ciklusba /17/. Ennek a mechanizmusnak a teljes megértéséhez azonban szükséges bizonyos, ebben a régióban térképezett mutánsok /pl. cy, sar/ részletesebb tanulmányozása /29,43,44/.

1.2. A lizogén állapot fenntartása

Ha a lizogén állapot már kialakult, a CII és a CIII gén transzkripcióját a represszor fehérje leállítja, sőt aktiv represszor molekulák jelenlétében magának a CI génnek a transzkripciója is változik. Ilyenkor az átíródás a gén jobb végéhez közel eső pr_m promotertől indul /promoter for represszor maintenance/, aminek következtében a represszor szint kb. tizedrészére csökken, ami azonban elegendő a lizogén állapot fenntartásához /29/. A pr_m promotertől kiinduló transzkripció autogén kontroll alatt áll, tehát maga a géntermék szabályozza saját génje átíródásának mértékét oly módon, hogy az állandó szinten maradjon /36/.



1.3. A lizogén állapot megszüntetése

A lizogén baktérium indukciója előidézhető pl. UV sugárzással, különböző vegyszerekkel, hőhatással, de az adott fásra jellemző gyakorisággal bekövetkezhet spontán is /7,12/.

A "megszüntető" funkció a cro gén működésével kapcsolatos, mert a gén által kódolt fehérje a CI gén jobb és bal oldali operátorához kötődve a korai fehérjék szintézisét kb. tízedrészére csökkenti, segíti az oopRNS átíródását /30-50-szeresére emelkedik/ és megindul az ori pontból az O és P gének /DNS replikáció génjei/ átíródása. Ezeknek a folyamatoknak a hatására a fág életciklusa a litikus ut felé tolódik el /27/.

UV sugárzás vagy vegyszeres /általában antibiotikum/ hatásra bekövetkező indukció esetén azt tapasztalták, hogy a lizogén állapot megszüntetését a represszor fehérjének a proteolitikus elhasítása indítja meg, ebben az esetben a folyamat fehérjeszintézist igényel /endopeptidáz/ /37,40,41/. Hővel indukálható mutánsoknál pedig azt tapasztalták, hogy a represszor fehérje egy kritikus hőmérséklet felett nem képes megfelelő ideig és mértékben a DNS megfelelő szakaszához kötődni, a bekövetkező allonterikus változás miatt, ami lehetővé teszi az addig represszált gének megnyilvánulását, és ezzel a fagnak a litikus ciklusba való átlépését /26/. A λ indukcióját bizonyos baktérium mutációk képesek megakadályozni /recA⁻ ill. ind⁻ baktérium/.

2. A lizogén baktérium immunitása

A baktérium lizogenitásának egyik jellemzője az immunitása, az azonos, vagy homoimmunis fággal való felülfertőzhetetlensége. Ilyenkor a fág DNS bejut ugyan a baktériumsejtbe, de lizist nem tapasztalunk, mert a profág által termelt represszor fehérje - immunitási anyag - a felülfertőző fág génjeinek megnyilvánulását is megakadályozza. Az un. lambdoid fágokból / λ , 424, ϕ 80 pl./ keresztezéssel sikerült olyan hibrideket létrehozni, amelyek más immunitási anyagot termelnek, tehát regulátor génjük a másik fágból származik /pl. λ imm⁴²⁴, stb/. A λ és a P22 fág, bár más-más baktériumot fertőznek, géntérképük hasonlósága azonban lehetővé tette, hogy olyan fágot hozzanak létre, amelynek immunitási, korai kontroll és DNS replikációs génjei λ -ból, míg a többi a P22-ből származott. /1,15,16, 45/.

A többi lambdoid - E.coli - fágból eltérően a P2 jelzésűnek csak egy C /regulátor/ génje van, tehát feltehetően jobban hasonlít a regulációs mechanizmusa a Rhizobium fágokéhoz.

3. A λ fág regulátor génje és a represszor fehérje

A mérsékelt fágok tarfoltja zavaros, a bennük található lizogén baktérium miatt, míg azok, amelyek valamilyen mutáció miatt képtelenek lizogenizálni a baktériumot tiszta tarfoltot adnak. A λ fágban a tiszta tarfoltot adó mutációk három génhez lokalizálhatók: CI, CII, CIII-hoz, ill. van

egy negyedik csoport, az un. cy régióba tartozók. Ezek közül a CI regulátorgén és annak terméke játssza a legfontosabb szerepet /8,12,14,18,22,44/. A fág represszor létét és szerepét zigótikus indukcióval bizonyították /19/.

3.1. A regulátor gén /CI gén/

A különböző típusu mutánsok vizsgálatával megállapították, hogy a megváltozott represszor szintézist három régióban bekövetkezett mutáció okozhatja:

1. Struktur gén mutációja
2. Az operátor génben bekövetkezett mutáció
3. A promoter gén megváltozása

3.1.1. A represszor fehérje struktur génje

A struktur gén a represszor fehérje aminosav sorrendjére vonatkozó információt hordozó DNS szakasz. A fágkromoszóma jobb karján helyezkedik el, a $31 \cdot 10^6$ dalton nagyságu λ DNS molekulának kb. 2 %-nyi része. A géntérképe egy A /bal/ és egy B /jobb/ oldali régióra bontható, az izolált mutánsok eltérő viselkedése alapján: az "A" mutánsok: hőindukciója fehérjeszintézist nem igényel, míg a "B" mutánsok: fehérjeszintézist gátló anyagok jelenlétében nem indukálhatók /24,15,5/.

3.1.2. Az operátor gén

A fágban a CI gén jobb és bal oldalán is találunk operátor régiókat / 75-75BP hosszúságúak/. Mindkét oldalon 3-3 represszor kötőhelyet azonosítottak, amelyek 17 bázispár hosszúságú, majdnem tökéletesen palindrom szekvenciák, rendkívül hasonló felépítéssel. Szimmetriaviszonyaikból következően elsősorban dimérek megkötésére alkalmasak. A represszor kötőhelyeket 6-7 bázispárnnyi A-T gazdag térkitöltő /"spacer"/ régiók választják el egymástól. Az egyes operátor helyek működésbeli eltérést mutatnak, ami egyfajta szabályozást tesz lehetővé már ezen a szinten is. Az O_{R1} -hez a legnagyobb a represszor aktivitása, -de általában is igaz, hogy az O_R affinitása 5-10x erősebb az O_L -énél- az ide kötődött represszor molekulák csökkentik cro és növelik CI gén transzkripcióját. O_{R2} annyi működésbeli különbséget mutat, hogy magasabb represszor koncentrációnál töltődik fel, míg O_{R3} -hoz csak akkor kötődnek a represszorok, ha a másik két kötőhely már telítődött, tehát a represszor koncentráció nagyon magas. A bal oldali operátorok működése ezzel teljesen megegyezik, csak O_{L3} szerepét nem tisztázták még. A virulens mutánsokat vizsgálva azt tapasztalták, hogy ezek O_{L1} ; O_{L2} és O_{R2} -höz lokalizálhatók /25,26,28/.

3.1.3. A promoter gén

A promoter régiók meghatározása nehezebb feladat volt, mint az operátoroké. Elméletileg azok úgy definiálhatók, mint

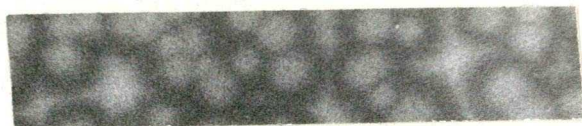
azok a DNS szekvenciák, amelyek nélkülözhetetlenek az RNS polimeráz felismeréséhez, kötődéséhez és a transzkripció iniciálásához. Az eddigi vizsgálatok alapján a λ fágban az operátor és a promoter régiók átfedőek. A bal oldali promoter az O_{L1} - O_{L2} közötti "spacer" régióba térképezhető /PL/, míg a jobb oldali prn promotert az O_{R2} - O_{R3} szakaszok közé térképezték /36/.

3.2. A λ fág represszor fehérjéje

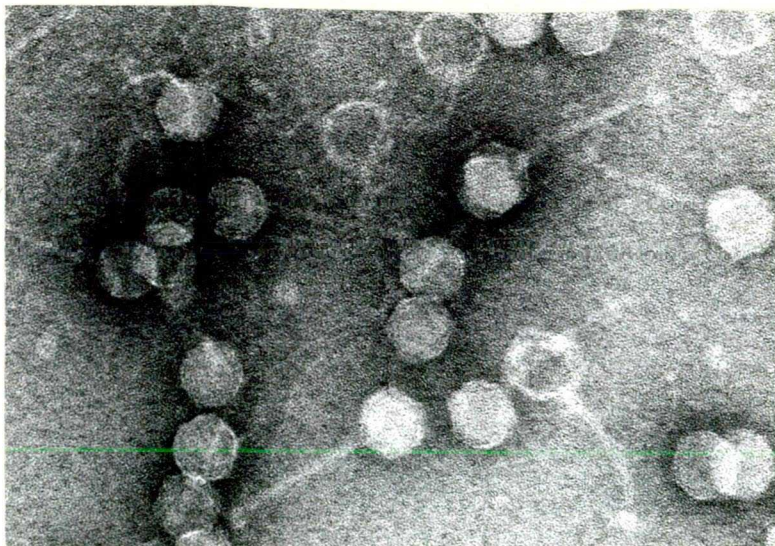
A CI gén terméke az un. represszor fehérje vagy immunitási anyag 27.000 molekulasúlyu, monomer szerkezetű, savanyu protein. In vivo és in vitro egyaránt megfigyelték, hogy egy monomer - oligomer egyensúly alakul ki, ahol az oligomer /dimer vagy tetramer/ az aktív forma, ez képes az operátorhoz kötődni. Stabil lizogén sejtekben kb. 200 monomer represszor molekula található sejtenként. A fehérje-DNS kötődése rendkívül erős $/K_d=10^{-9}-10^{-10}/$. Az eddigi vizsgálatok alapján feltételezik, hogy a represszor molekula N-terminális vége kötődik specifikusan a DNS-hez, ennek ismert az első 51 aminosava, ami viszont főleg bázikus aminosavakat tartalmaz. A λ fágnál a CI gén esetében kimutattak interallélikus komplementációt, amely szerint a regulátor gén "A" régiója és "B" régiója között bizonyos körülmények között igen erős működéskiegészítés figyelhető meg /24,23/.

4. A Rhizobium meliloti 16-3 fág jellemzése

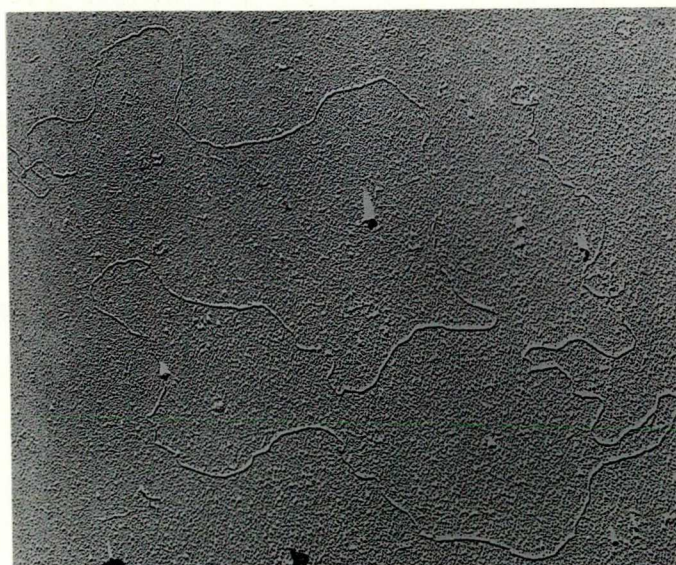
A bakteriofágot talajmintából 1960-ban Ürdögh és Szende izolálta /35/. A temperált fágok csoportjába tartozik, vad típusnak tekintjük azt, amely 28°C-on és 36°C-on egyaránt zavaros tarfoltot ad.



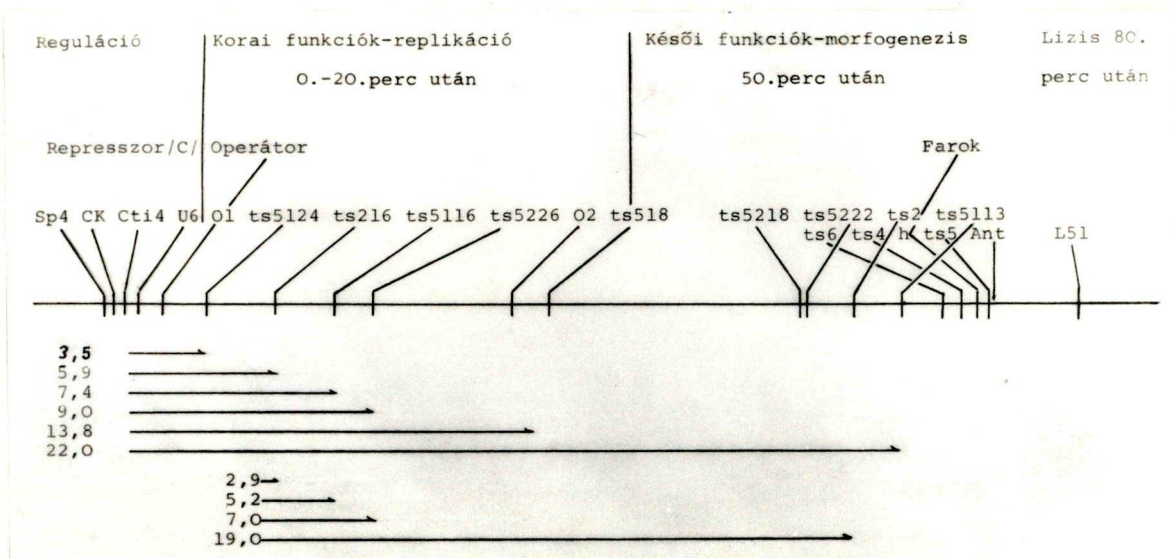
A fág az E.coli λ fágjához hasonló felépítésű, elektronmikroszkópos felvételeken jól elkülöníthető a sokszögletű fej, a fark és a farki rostok is jól láthatók néhány esetben; megállapítható hogy nagysága is hasonló a λ fághoz.



A fejből található nukleinsav kétfonális DNS, amely szintén rendelkezik un. ragadós véggel. Nagysága kb. 32Md, aminek megállapítása restrikciós térképezéssel, a λ fággal való összehasonlítás alapján történt [9].



A 16-3 fágból izolálhatók olyan mutánsok, ahol a mutáció a C regulátor génben következett be; ezek a hőmérséklet függvényében mutatnak fenotipusos változást; - tí mutánsok. Vannak olyanok, ahol ez feltétlenné válik, tehát a fág fenotipusa bármely hőmérséklete tiszta tarfoltot mutat; - ilyenek pl. az sp és az U sorozat mutánsai. Sőt ide tartoznak a deléciós mutánsok is, amelyekben a DNS kisebb-nagyobb darabja hiányzik. A következő ábrán néhány mutáns térképhelyzetét mutatjuk be.



A fágkromoszóma nagyobb részét kitevő - korai funkció, késői funkció, lizis - elsősorban ts /hőérzékeny/ mutánsok ismertek. Funkcionális analizissel állapították meg, hogy a teljes fággenom 43 cisztront alkot. A rekombinációs analizissel kapott kromoszómaterkép hossza pedig 40 térképegység. /11,20,30,31,32,33,34,35,38,42/

5. Célkitűzések

Vizsgálataink célja a *Rhizobium meliloti* 36 jelzésű mérsekelt fág regulátor génjének vizsgálata volt. A kísérletek alapjául a 16-3 fággal végzett kísérletek szolgáltak, amely szerint a két fág heteroimmunis /Szende, Plant and Soil, 1962/,

azonban a 16-3 fág a 36 jelzésű fággal rekombinál /Deák, Orosz/ azonos immunitási anyagra érzékeny, tehát homoimmunis, ami arra utal, hogy a két fággenom majdnem vagy teljesen megegyezik, tehát a kapott eredmények összevethetők. A 16-3 fág-nak három hővel indukálható /ti/ mutánsa ismert /ti3, ti4, ti5/ /Orosz, Sik/. Az ezekkel végzett vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a ti mutációk a fágkromoszóma bal szélén lévő C gén-be térképezhetők, egymással nem komplementálnak, tehát azonos cisztronba tartoznak. Fenotípusuk, hőmérséklet érzékenyséjük alapján azonban jól elkülöníthetők egymástól /31,32/. Mi a kísérleteinket a 36 jelzésű fágból NTG kezelés után izolált ti mutánsokkal végeztük, és a következőket tűztük ki célul:

- a mutánsok fenotípusos és hőindukciós jellemzése
- a mutációs pontok elhelyezése a genetikai térképen
- kettős /ti-ti/ mutánsok vizsgálata
- ti mutánsokkal lizogénizált sejtek immunitásának vizsgálata
- a ti mutánsok komplementációs vizsgálata

6. Anyagok és módszerek

Baktériumtörzsek: Rhizobium meliloti 41 prototróf, vad típusu baktérium /izolálta Szende, Ördögh, 1960/.

Lizogén törzsek: R.m.41 /16-3/; /ti3/; /ti4/; /ti5/; /A1/; /A2/; /B2/; /B3/; /B4/; /B6/.



Fágtörzsek: 16-3: a Rhizobium meliloti 41 mérsékelt, vad típusu fágja

36: a 16-3-mal homoimmunis, mérsékelt, vad típusu fág /Szende, Ürdögh/

A 16-3 fág hővel indukálható mutánsai: ti3, ti4 ti5 /Orosz L./

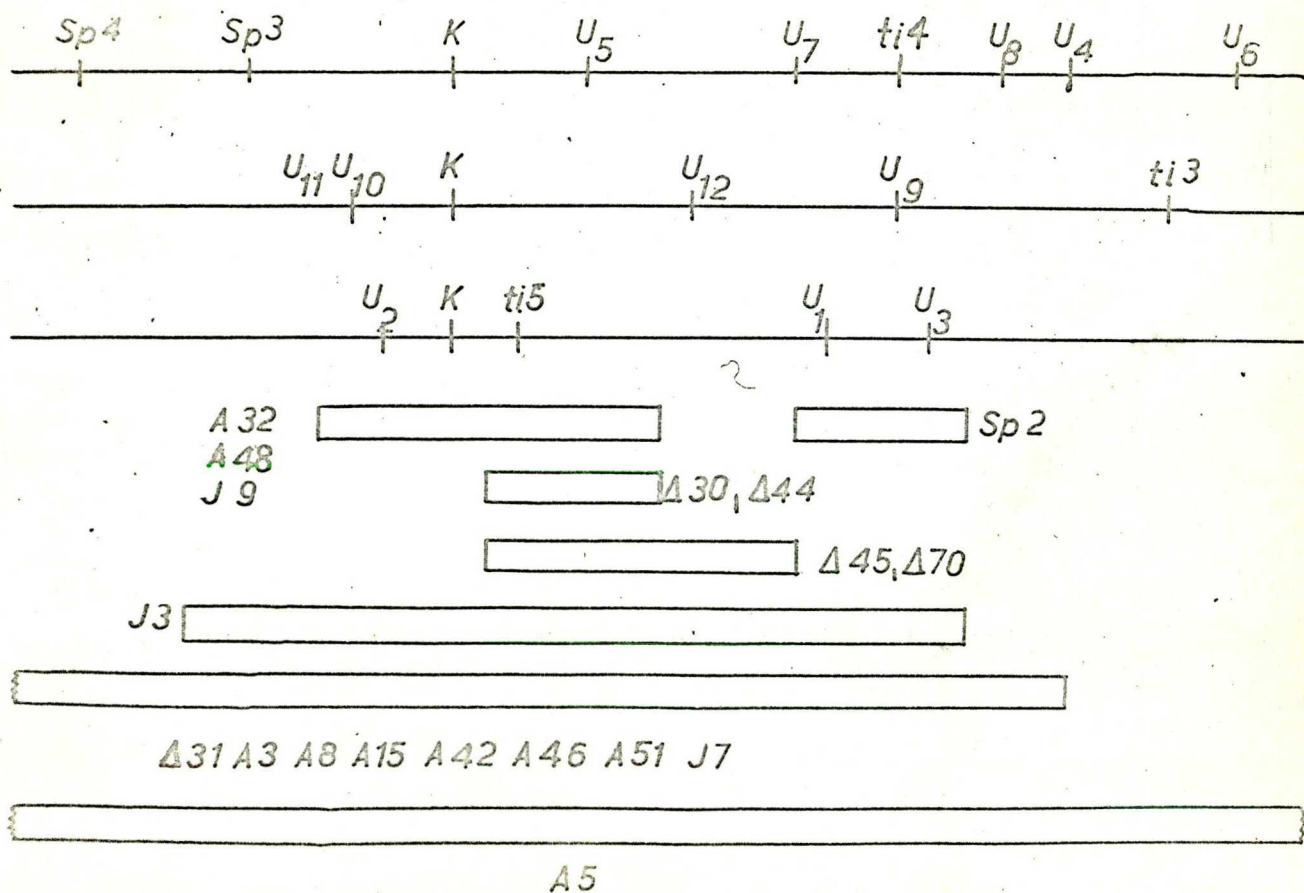
A 36 fág hővel indukálható mutánsai: A1, A2, B2, B3, B4, B6

A 16-3 fág virulens mutánsai: w1, w2, 24/4 /Orosz L./

A 16-3 fág kettős mutánsai: ti4-sp3, ti4-sp4, ti4-U6 /Orosz L./

A 16-3 fág deléciók mutánsai: A5, A31, A32, sp2, A30, A45, A70, J3, J7 /Orosz L., Jávor J. ,

Ascher Z. nem közölt munkája 1975-76/.



Táptalajok: YTB /teljes/ tápoldat: 1g NaCl, 10g tripton,
1g élesztőkivonat, desztillált vízzel kiegészítve
1000 ml-re + 1ml 1M CaCl₂ + 1 ml 1M MgSO₄;
pH=7,2-re beállítva NaOH-val.

YTA alapagar: YTB tápoldat + 1,4 % Difco agar

YTA fedőagar: YTB tápoldat + 0,6 % Difco agar

NTG oldat: 1000 g/ml NTG trisz-maleinsavas
pufferben /pH=6,1/.

Rhizobium meliloti 41 baktérium szaporítása: YTB tápoldatban,
28°C-on, levegőztetéssel /lásd ábra/

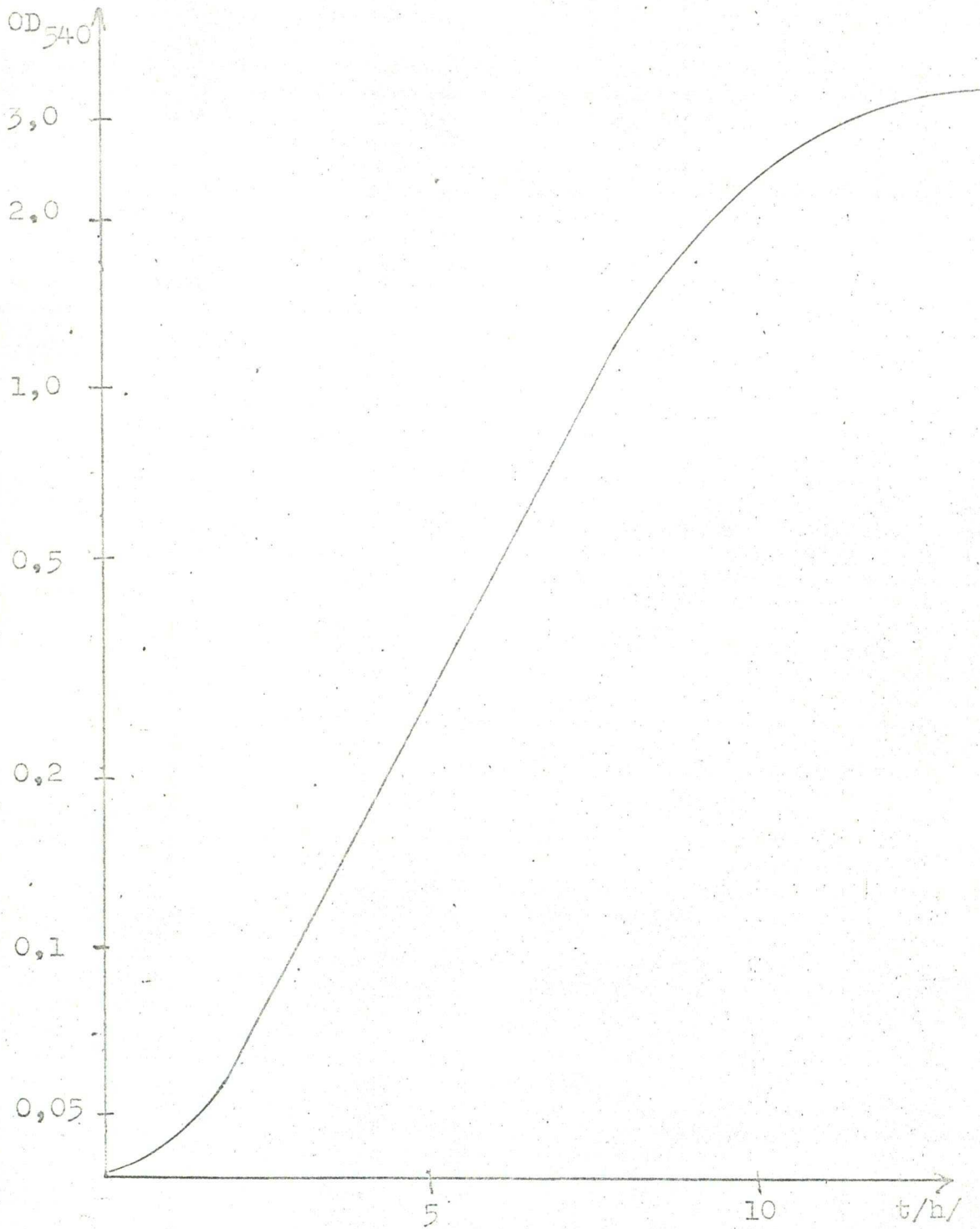
Fágszaporítás: R.m.41 baktérium 0,5 ml-ével beoltunk 4,5 ml
YTB tápoldatot és ehhez adunk vagy 0,1 ml fág-
szuszpenziót, vagy egy a szilárd táptalaj felüle-
téről kivágott egyedi tarfoltot.

Baktériumszám meghatározása:

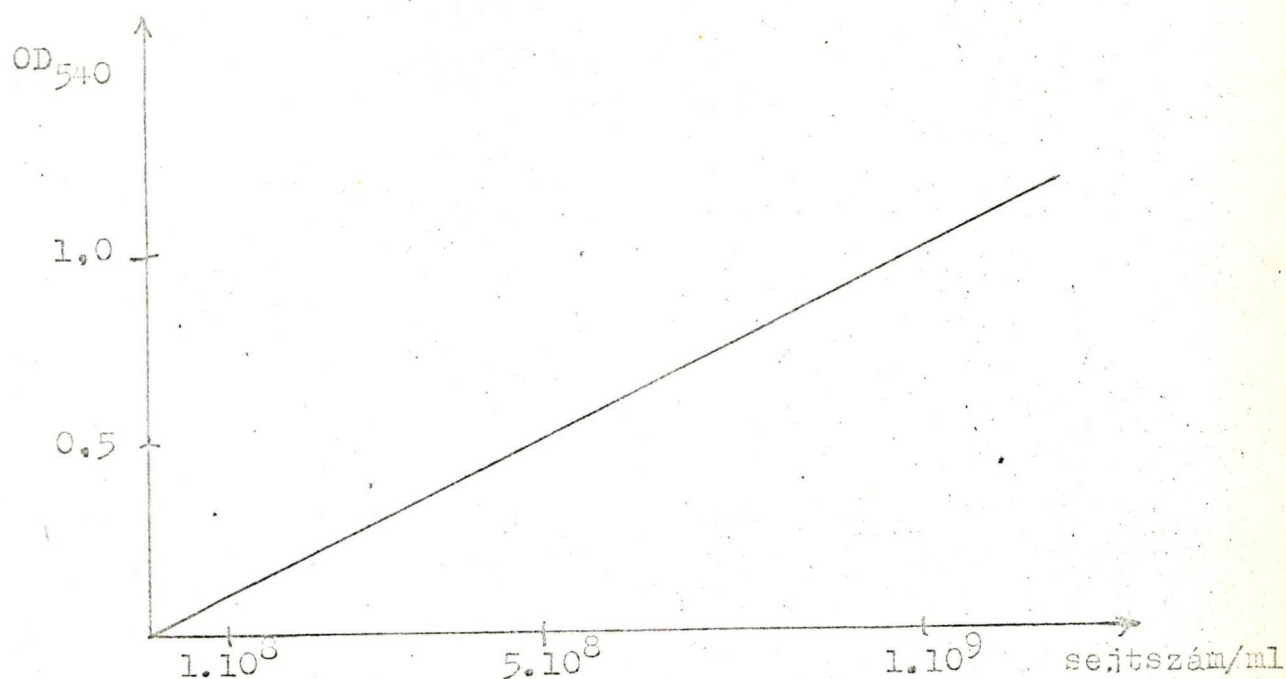
- 1./ szilárd táptalaj felületére szélesztett, meg-
felelően hígított baktériumszuszpenzióból
48 óra múlva kinövő telepek számából
- 2./ Spektrofotometriás eljárással - az 540 nm-n
mért elnyelés alapján kalibrációs görbe
segítségével meghatározható a sejtszám /ml

Fágszuszpenzió töménységének meghatározása: Adams /1959/

Bacteriophages c. könyvében leírt kettős-agar
módszerrel



Rhizobium meliloti 41 szaporodási görbéje / 28 °C-on, levegőztetés mellett/



Rhizobium meliloti 41 kalibrációs görbéje fotometriásan történő sejtszám meghatározáshoz

Lizogén baktérium izolálása: A baktériumpázsitra cseppentett fágból kapott zavaros tarfoltból /28°C-on/ kiemelt baktériumokat szélesztettük, majd a kinövő egyes telepeket teszteltük: steril fogpiszkálóval érzékeny baktériumpázsitra vittük, ahol a megjelenő litikus udvar a profág jelenlétére utal.

Lizogén baktériumok hőindukciós vizsgálata:

1./ Lemezen: a megfelelően kihígított lizogén baktériumszuszpenziót 36°C-ra előmelegített YTA lemez felületére szélesztettük, megfelelő ideig /0,1, 2,3....24 óráig/ 36°C-os termosztátban tartottuk, majd nem-indukáló hőmérsékletre /28°C-ra/

helyeztük a lemezeket és a 48 óra elteltével kinövő telepek számából határoztuk meg a hőindukció kinetikáját.

2./ Folyadékban: 10 ml YTB folyadékot beoltottunk lizogén baktériumszuszpenzióval úgy, hogy az $OD_{540} = 0,2-0,4$ legyen, ezután a szuszpenziót 36°C -os vízfürdőben, levegőztetés mellett szaporítottuk és az OD_{540} változását mértük meghatározott időközönként. Ennek változásából a kalibrációs görbe segítségével megállapítható a hőindukció mértéke.

Bakteriofágok keresztezése: a keresztezendő fágokat 1 ml térfogatban kevertük össze $5-5 \cdot 10^9$ / majd 1 ml logaritmusos fázisban levő R.m.41 baktériumot adtunk hozzá. 20 percig jégen állni hagytuk - fágok adszorbeálódásához szükséges idő - ezután a szuszpenziót lecentrifugáltuk /20 perc; 4000 ford. szám/ kétszer 1-1 ml YTB-ben átmostuk, az üledéket szintén 1 ml YTB-ben vettük fel, 1000-szeresére hígítottuk, majd 28°C -on levegőztetéssel 300 percig szaporítottuk. 1/10 térfogatnyi kloroform hozzáadása után meghatároztuk a szülői és rekombináns típusu fágok számát fágtitrálással.

ti mutánsokkal lizogenizált sejtek immunitásának mérése:

1 ml friss lizogén baktériumot lecentrifugáltunk, 1 ml YTB-ben felszuszpendáltuk és hozzáadtunk 0,1 ml

virulens fágot /w1, w2 vagy 24/4/ olyan töménységű szuszpenzióból, hogy a multipllicitás 1;5 ill. 10 legyen. 20 percig állni hagytuk jégen, lecentrifugáltuk, 1-1 ml YTB-vel kétszer átmostuk, szintén 1 ml YTB-ben vettük fel, majd 1000-szeresére higitottuk és 28°C-on levegőztetéssel 300 percig szaporítottuk. 1/10 térfogatnyi kloroform hozzáadása után meghatároztuk a kiszabadult fágok számát.

ti mutánsok folyadék komplementációjá:

a friss lizogén baktériumot lecentrifugáltuk, 0,9 ml YTB tápoldatban felszuszpendáltuk, majd a vizsgálni kívánt másik fágmutánsból 0,1 ml-t adtunk hozzá, úgy hogy a multipllicitás 5-10 között legyen. 30 percig állni hagytuk jégen, majd lecentrifugáltuk, és 1-1 ml YTB-vel kétszer átmostuk. Az üledéket 1 ml YTB-ben felszuszpendáltuk és 30 percig 28°C-on levegőztetéssel szaporítottuk. Ezután 36°C-ra előmelegített YTB-vel 10-szeresére higitottuk és a továbbiakban 36°C-on levegőztetéssel szaporítottuk. A 10-szeres higitás időpontját tekintettük t=0-nak, és ettől kezdve meghatározott időközönként mértük a szuszpenzió optikai denzitását 540 nm-nél, és ennek növekedéséből ill. csökkenéséből következtettünk a lizogén állapot fennmaradására vagy a szuszpenzió lizisének bekövetkezésére.

Kaiser és Levine féle komplementációs eljárás: a két vizsgálandó fág keverékét cseppentjük az érzékeny baktérium-pázsitra /Orosz L. diplomadolgozat 1966/. ti mutánsok esetében ezzel az eljárással csak a lizogén állapot

kialakításának képessége vizsgálható.

7. Eredmények

7.1. Hővel indukálható mutánsok fenotipusos jellemzése

Rhizobium meliloti 41 36 jelzésű fágjából 100 \times /ml NTG kezelés után ti /hővel indukálható/ mutánsokra szelektáltunk, a következő módon: a 36°C-on tiszta tarfoltot adó fágokat egyedenként teszteltük 28°C-on. Azok, amelyek ezen a hőmérsékleten zavaros tarfoltot adtak, voltak a számunkra megfelelő ti mutánsok. 5577 mutagenizált fágot vizsgáltunk meg, ezek között 36°C-on tiszta tarfoltu volt 458 /8,21.10⁻² gyakoriság/ míg ezek közül ti-nek bizonyult 6 mutáns, ami a tiszta tarfoltuakra vonatkoztatva 1,31.10⁻², az összes megvizsgált fágra vonatkozóan pedig 1,08.10⁻³ mutációs gyakoriságnak felel meg.

A R.m. 41 baktérium 36 jelzésű fágjából izolált ti mutánsok a következők: A1; A2; B2; B3; B4; B6.

A fenotípus vizsgálat célja annak megállapítása volt, hogy melyik az a hőmérséklet, ahol a fág által termelt represszor aktivitása olyan mértékben csökken, hogy a fág képtelen a lizogén állapot létrehozására, vagy tartós fenntartására, tehát fenotipusosan tiszta lesz. A ti mutánsokat megtitráltuk 28, 30, 32, 34 és 36°C-on, és megvizsgáltuk az egyedi tarfoltok fenotipusát. Összehasonlításként elvégeztem a kísérletet a 16-3 jelzésű fág 3 ti mutánsával /ti3, ti4, ti5/, ami az összehasonlítást nagymértékben megkönnyítette.

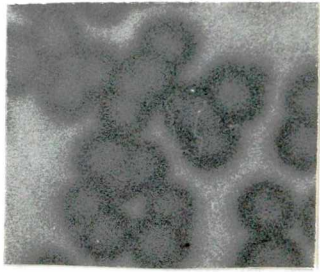
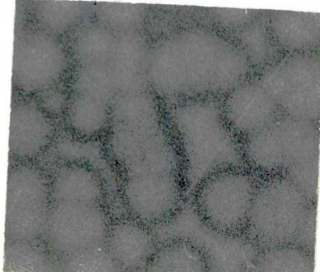
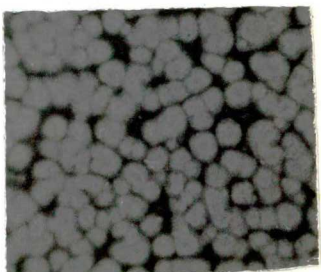
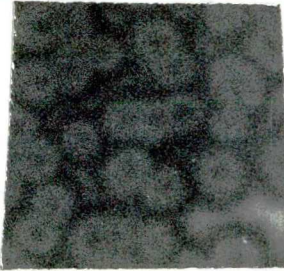

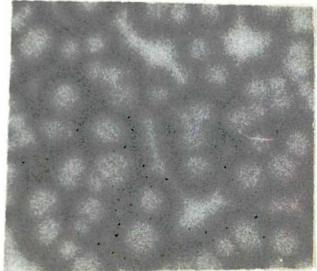
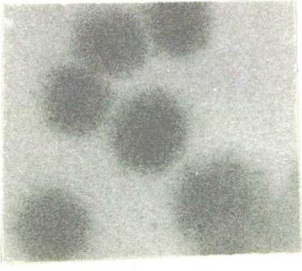
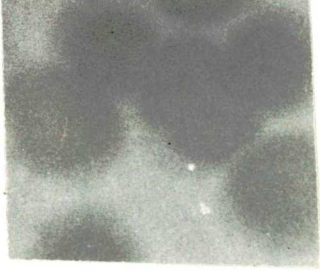
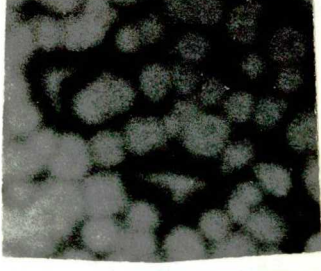
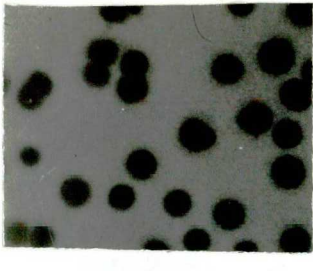
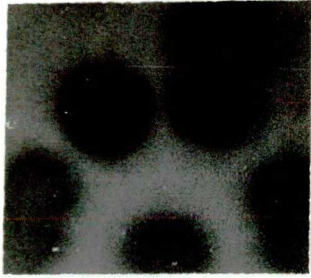
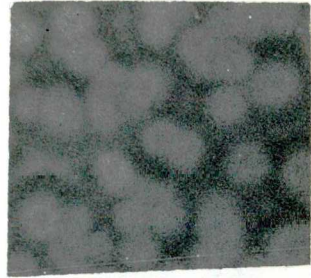
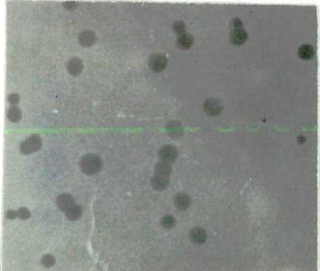
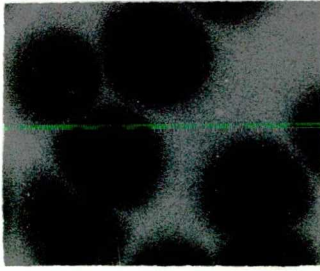
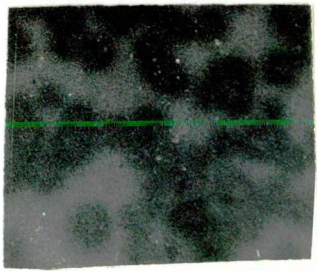
A hőmérséklet érzékenység jól jellemezhető a kritikus hőmérséklettel, ami alatt azt a hőmérsékletet értjük, ahol a vizsgált mutáns már tiszta tarfoltu fenotípust mutat /1. táblázat/.

fág °C	X ti3	X ti4	X ti5	A1	A2	B2	B3	B4	B6
28	t	t	t	t	t	t	t	t	t
30	t	t	t	t	t	t	t	t	t
32	t	c	t	t	c	c	t	t	c
34	c	c	t	c	c	c	t	t	c
36	c	c	c	c	c	c	c	c	c

1. táblázat : Tarfolt fenotípusok /c=clear=tiszta tarfolt, t=turbid=zavaros tarfolt /

X : Orosz L., Sik T. 1970

Vizsgálataink során három ilyen hőmérsékleti értéket találtunk, amelynek alapján a mutánsok a következőképpen csoportosíthatók:

°C	A2	A1	B4
28			
30			
32			
34			
36			

Kritikus hőmérséklet: 32°C: t14; A2; B2; B6

34°C: t13; A1

36°C: t15; B3; B4

Azonban az azonos csoportba tartozó mutánsok hőmérséklet érzékenysége sem teljesen azonos, így felállíthatunk egy érzékenységi sorrendet, amelyre az azonos csoportba tartozó tarfoltok vizuális összehasonlítása ad lehetőséget. Így a következő sorrendet kapjuk:

32°C: B6 } B2 } A2 } t14

34°C: A1 } t13

36°C: t15 } B3 } B4

/pl.: Gyengén zavaros tarfolt /t15/ zavaros tarfolt /B3/
erősen zavaros tarfolt /B4//.

7.2. A mutánsok hőindukciójának vizsgálata

A hőindukciós vizsgálatokat először szilárd táptalaj felületére szélesztett lizogén baktériummal végeztük el. Az ilyen eljárással kapott eredmények azonban összehasonlításra nem alkalmasak, mert a hőindukciós görbék lefutása kísérlet-sorozatonként változott; az azonban a 2. táblázat adataiból látható, hogy a ti mutánssal lizogenizált baktérium hővel indukálható.

Együttal megvizsgáltuk az un. "maradék" baktériumot is, amely 24-48 óra alatt sem indukálódott, tehát telepet képezett a lemezen. A vizsgálat a következő eredményt adta:

maradék baktérium	t _{i3}	t _{i4}	t _{i5}	A1	A2	B2	B3	B4	B6
lizogén/fá- got termelő baktérium %-ban	1	1	100	41	51	1	100	63	2

Megismételtük a hőindukciós kísérletet folyadékban, szintén 36°C-on. Az így kapott eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze. Az itt feltüntetett értékek a t=0 időpontra vonatkoztatott relatív OD₅₄₀ értékeket jelentik. A t=0 időpontban a lizogén baktérium szuszpenziók OD₅₄₀-t 0,100-0,120 közötti értékre állítottuk be. Az 1. ábrán látható, hogy az indukcióhoz ill. a lizis megindulásához 220-310 perc közötti idő szükséges, azonban sem ebből, sem a hőindukciós görbék lefutásából nem tudunk következtetni arra, hogy a bekövetkezett mutáció a represszor molekula funkcionálisan mennyire fontos részét érintette.

7.3. A mutációk térképhelyzetének megállapítása

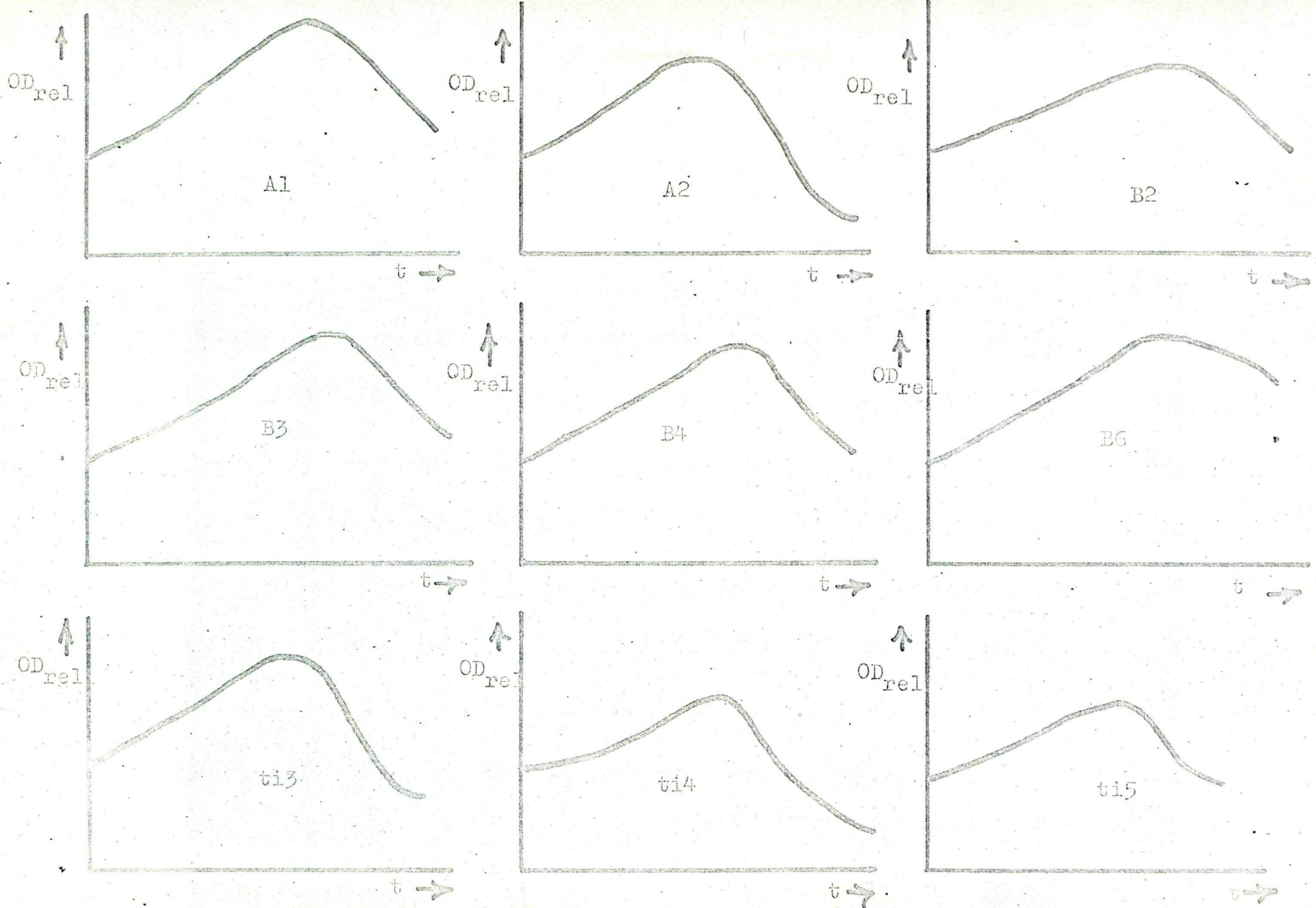
A t_i mutánsok genetikai térképezését ismert helyzetű /Orosz L. nem közölt adatok/ deléciós mutáns sorozat segítségével végeztük el, ami lehetővé tette a mutánsok hozzárendelését a genetikai térkép egy-egy szegmentjéhez; amit két deléciós mutáns határoz meg. Deléciós térképezés esetén,

2. táblázat: Hőindukció lemezen.

$t/h/$ 36°C mutáns	0	1	2	3	4	5	6	24
ti3	\bar{x} 1,0 $1,3 \times 10^9$	0,505	0,276	-	-	-	0,0079	0,0013
ti4	\bar{x} 1,0 $1,7 \times 10^9$	0,26	0,08	0,03	0,011	0,009	0,006	0,002
A1	\bar{x} 1,0 $3,4 \times 10^8$	0,66	0,55	0,43	0,37	0,15	0,06	0,003
A2	\bar{x} 1,0 $2,1 \times 10^8$	0,43	0,17	0,07	0,06	0,012	0,011	0,001
B2	\bar{x} 1,0 $9,7 \times 10^8$	0,69	0,23	-	-	-	-	0,039
B6	\bar{x} 1,0 $2,6 \times 10^8$	0,42	0,17	0,08	0,05	-	-	0,018
16-3	\bar{x} 1,0 $5,5 \times 10^8$	1,00	1,01	0,98	0,95	1,05	1,06	0,97

A táblázatban feltüntetett adatok a $t=0$ időpontra vonatkoztatott relatív telepszámot jelölik.

\bar{x} = a fág-titer a $t=0$ időpontban

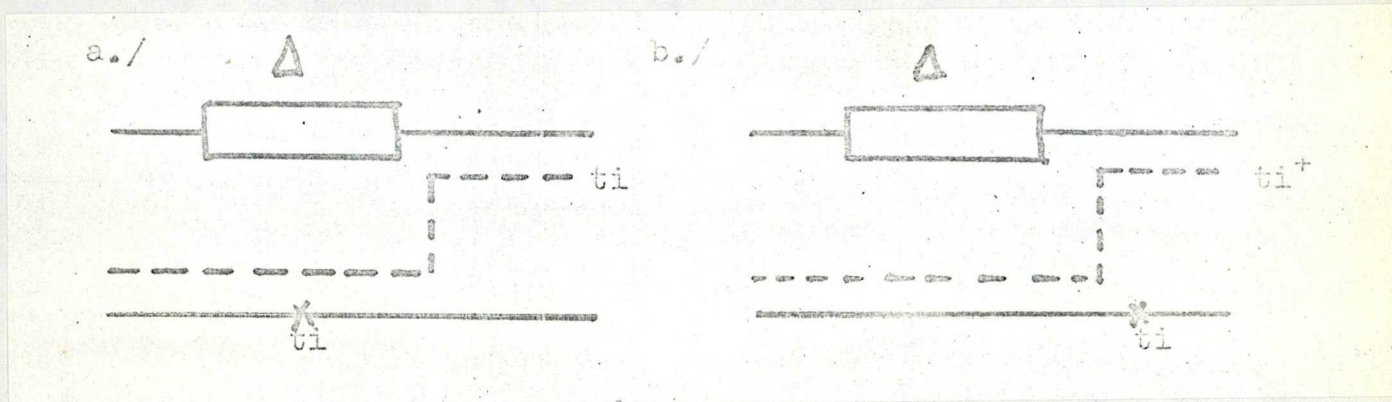


2. ábra : Hőindukció folyadékban

mutáns idő /perc/	ti3.	ti4	ti5	A1	A2	B2	B3	B4	B6
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
90	1,40	-	-	1,36	1,43	-	-	-	-
150	1,69	-	-	1,68	1,77	1,41	-	-	-
180	-	1,36	1,56	-	-	1,50	1,87	1,81	1,82
210	-	1,57	1,63	-	-	1,67	1,99	1,85	1,98
240	2,08	1,66	1,67	2,18	1,93	1,64	2,03	2,13	2,10
270	-	1,42	1,61	-	-	1,66	2,14	1,91	2,13
300	1,66	1,13	1,29	2,28	1,10	1,70	2,24	2,04	2,18
320	1,42	-	-	2,30	0,78	-	-	-	-
330	-	0,90	1,07	-	-	1,53	1,84	1,77	2,05
340	1,06	-	-	1,88	0,56	-	-	-	-
360	0,84	0,69	1,02	1,72	0,51	1,45	1,56	1,53	2,02
390	0,68	0,47	-	1,32	0,43	-	1,42	1,41	-
420	-	0,41	-	-	-	1,07	1,26	1,16	1,70

3. táblázat : hőindukció folyadékban. Az adatok a t=0 időpontra vonatkoztatott relatív OD értékek.

amennyiben a deléció átfedi a pontmutánst /a/, a keresztezésből származó utódfágok között vad típusu rekombinánst nem találunk; míg, ha a vizsgált pontmutáns kívül esik a deléción /b/, az utódok között bizonyos gyakorisággal vad típusu rekombinánsokat találunk.



A megfelelő és a táblázatban feltüntetett keresztezések elvégzése után a ti mutánsainkat a fág C /regulátor/ génjének egy-egy szegmentjéhez rendelhettük - a B6 jelzésű mutáns kivételével. /4. táblázat: a + jelek mellett feltüntetett adatok a vad típusu rekombinánsok számát jelentik/

A B6 jelzésű mutáns helyzetének egyértelmű megállapításához néhány hárompontos keresztezést kellett végeznünk, mert a deléciós térképezés ebben az esetben nem adott egyértelmű eredményt. Ugyanúgy jártunk el az A2 mutáns esetében is, bár itt elsősorban a kapott eredmények helyességének ellenőrzése volt a cél /Orosz L. kandidátusi értekezése, Rostás K. diplomadolgozat/. A keresztezések kiértékelésénél a vad fenotípusu rekombináns kategória gyakoriságából a két ismert helyzetű



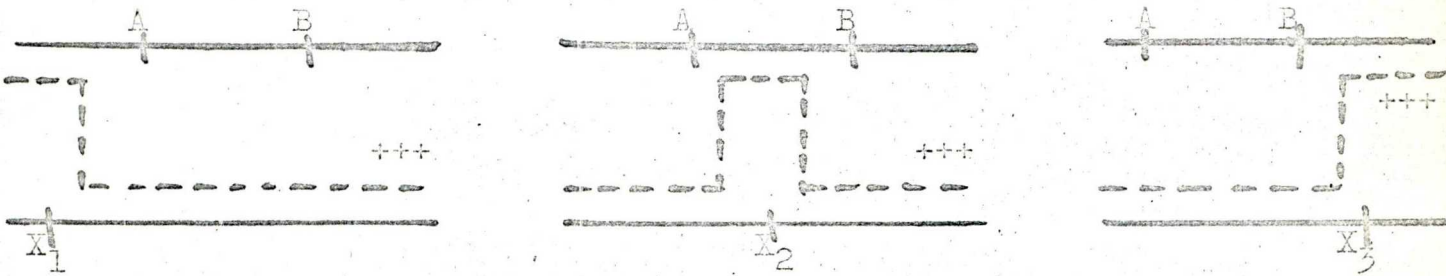
deléció \ ti	A1	A2	B2	B3	B4	B6
A5	0	0	0	0	0	0
A31	+ 17	0	0	0	0	0
A32	+ 16	+ 42	+ 20	0	0	+ 120
sp2	+ 41	+ 50	0	+ 8	+ 5	+ 72
30	/	/	/	+ 48	+ 15	/
70	/	+ 41	+ 34	/	/	+ 52
J3	/	0	/	0	0	+ 60
J7	/	+ 42	+ 76	/	/	+ 115

4. táblázat : Deléciós térképezés összefoglalása

/ 0 = nincs rekombináció

+ = van rekombináció ; Σ = rekombinációk/lemez./

mutációhoz viszonyítva megállapítható a kérdéses pont helyzete: legyen A és B a két ismert pont, míg X_1 ; X_2 és X_3 az ismeretlen pont - ill. annak három lehetséges helye:



A vad típusu rekombinánsok száma a következőképpen alakul:

$$A^+B^+X_1^+ \quad \text{vagy} \quad A^+B^+X_3^+ \quad \gg \quad A^+B^+X_2^+$$

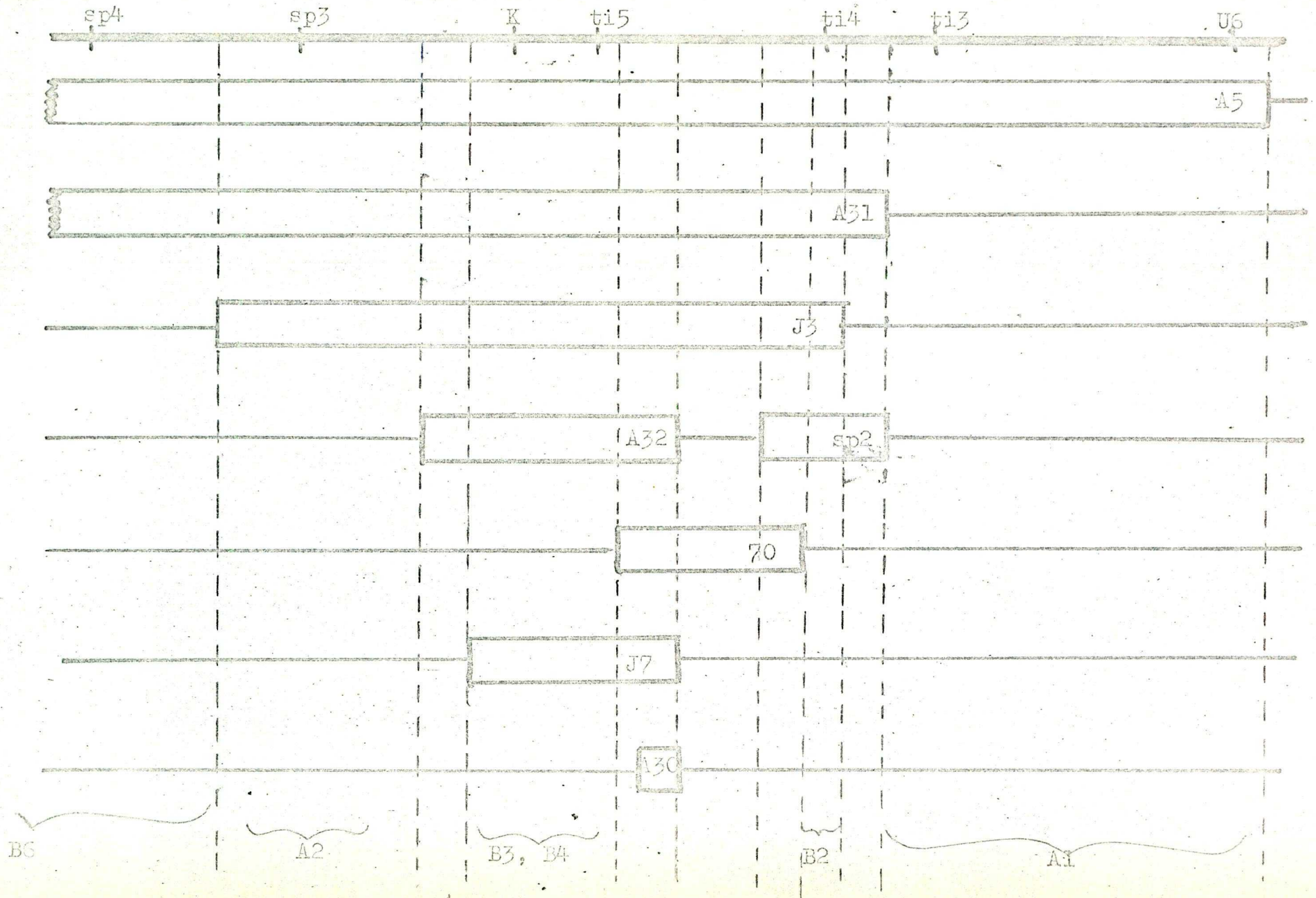
A kettős mutánsokkal végzett keresztezések a következő eredményt adták:

A2 x ti4 - sp3	-	5,4.10 ⁻⁵	} C ⁺ ti ⁺ gyakoriság
x ti4 - sp4	-	6,1.10 ⁻⁵	
x ti4 - U6	-	2,1.10 ⁻⁴	
B6 x ti4 - sp3	-	5,8.10 ⁻⁴	} C ⁺ ti ⁺ gyakoriság
x ti4 - sp4	-	4,0.10 ⁻⁵	
x ti4 - U6	-	1,7.10 ⁻³	

Ebben az esetben $C^+ = sp3^+; sp4^+; U6^+$
 $ti^+ = ti4^+; A2^+; B6^+$

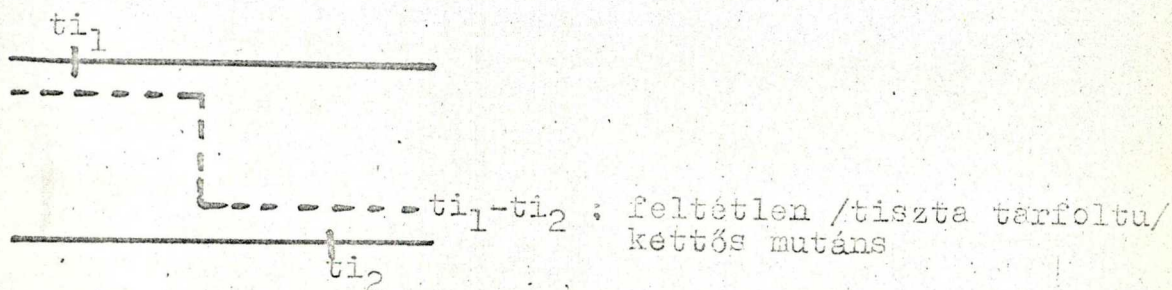
A deléciós térképezés és a hárompontos keresztezés adatai alapján a 36 jelzésű fág ti mutánsait a következőképpen tudtuk elhelyezni a géntérképen: /1. ábra/.

1. ábra : Deléciós térképezés összefoglalása

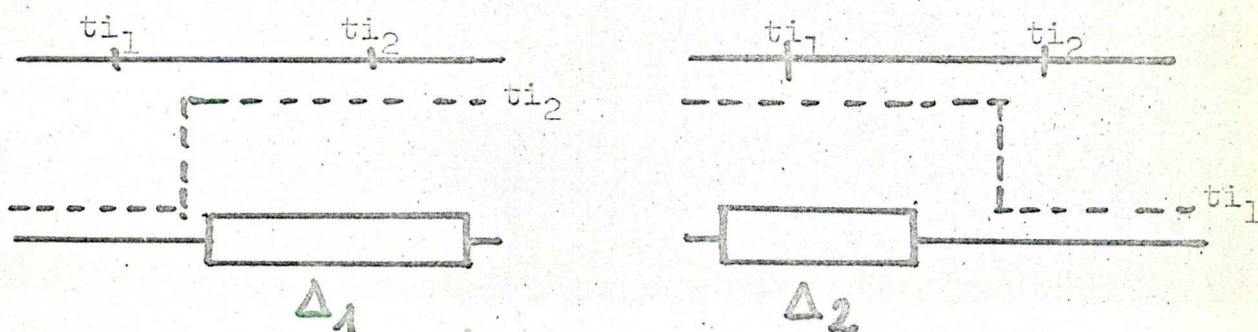


7.4. Génen belüli szupresszió

A kísérletsorozatnál abból - 16-3 fágánál Orosz L. által tapasztalt - feltevésből indultunk ki, hogy két ti mutáció együttesen a represszor fehérje teljes inaktiválódásához vezet, tehát két ti mutáns keresztezésekor bizonyos gyakorisággal feltétlen /tisztá tarfoltu/ mutánsokat kell kapnunk:



A létrehozott kettős ti mutánsok szerkezetét deléciós-rekombinációs analízissel a következő elv alapján igazolhatjuk:



A keresztezésből kapott utódok között a 28°C -on zavaros tarfoltot adó rekombinánsoknak azt a ti mutációt kell tartal-

mazniuk, amelyet a deléció átfedett. Ennek igazolása - a ti mutációk azonosítása - a kritikus hőmérsékletek különbözősége alapján lehetséges. Csak abban az esetben fogadtuk el, hogy a létrehozott mutáns valóban ti-ti szerkezetű volt, ha mind a két mutációt sikerült ilyen módon azonosítani.

Az elvégzett keresztezések közül azonban néhány kombinációban nem sikerült az utódfágok között tiszta tarfoltukat találni /5. táblázat/. Ezen keresztezések többségében az egyik szülő a B6 jelzésű mutáns volt. Ezek alapján feltételezhető, hogy az a molekularész, amelyet a mutáció érint kiténtetett szerepet játszik a fág regulációban.

Keresztezés	összes fág $\times 10^6$	"c" fág	"c" fágok gyakorisága
ti3 x A1	5,0	$4,9 \cdot 10^4$	0,01
x A2	1,9	$1,04 \cdot 10^5$	0,054
x B2	5,6	$9,5 \cdot 10^4$	0,017
x B3	7,0	$6,9 \cdot 10^4$	0,01
x B5	1,1	-	-
A1 x A2	3,9	$1,3 \cdot 10^3$	0,003
x B2	3,8	$1,2 \cdot 10^3$	0,003
x B3	1,3	$2,5 \cdot 10^4$	0,02
x B4	3,7	$1,1 \cdot 10^4$	0,003
x B6	4,7	-	-
A2 x B2	48,0	$1,4 \cdot 10^6$	0,029
x B3	24,0	$1,9 \cdot 10^5$	0,082
x B4	22,0	$1,44 \cdot 10^6$	0,061
x B6	52,0	$1,6 \cdot 10^4$	0,0003
B2 x B3	74,0	$8,1 \cdot 10^5$	0,011
B2 x B4	52,0	$1,4 \cdot 10^6$	0,027
B3 x B6	48,0	-	-
B4 x B6	9,0	-	-

A "c" fág spontán előfordulási gyakorisága a szülői típusokban minden esetben kisebb volt mint 10^{-5} .

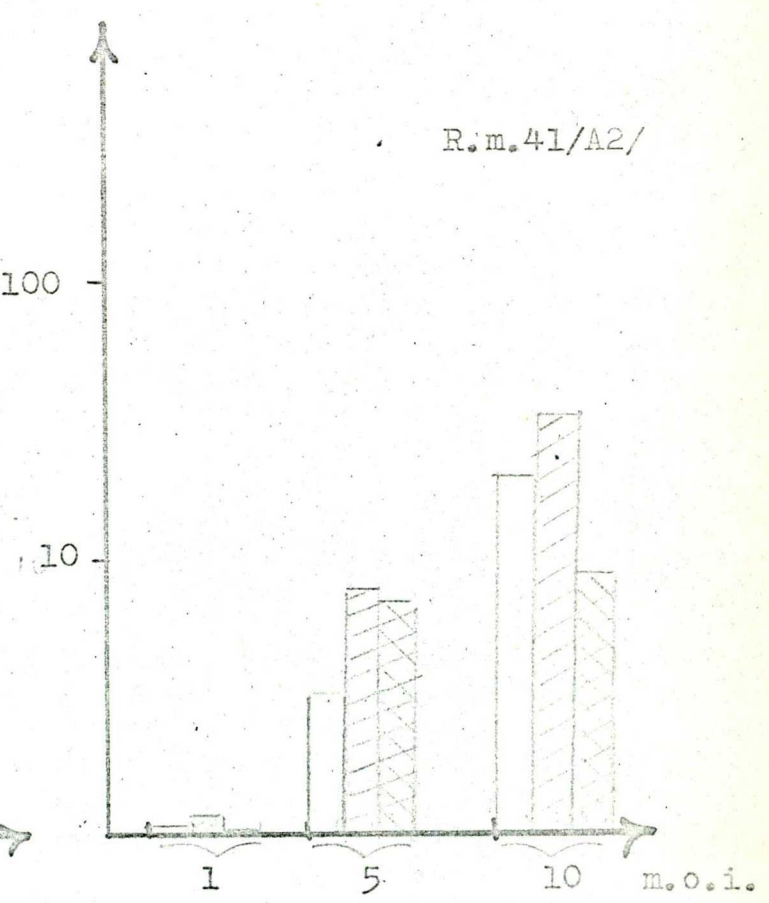
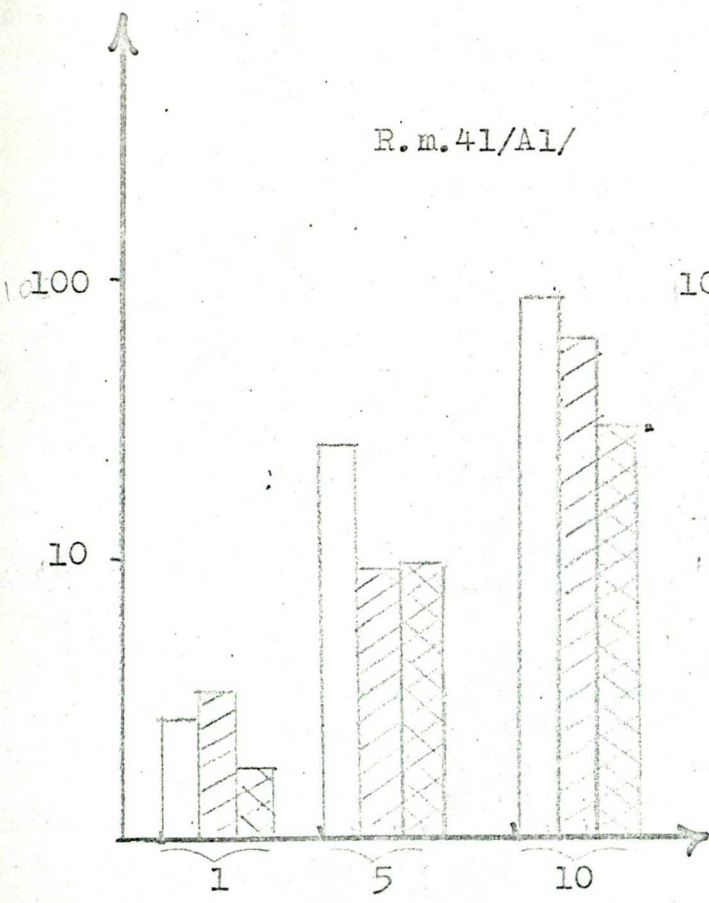
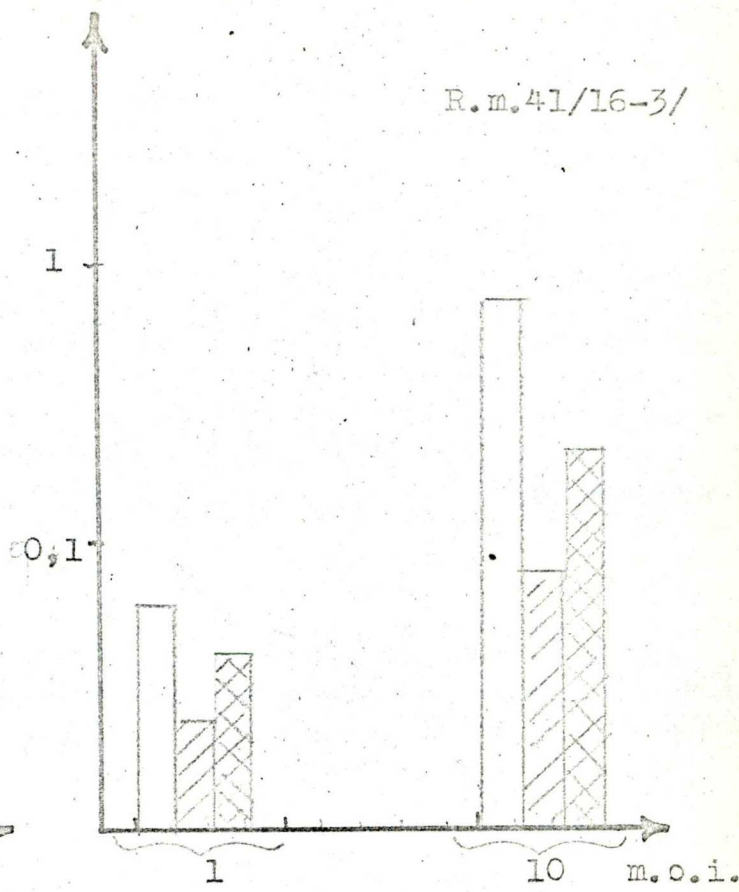
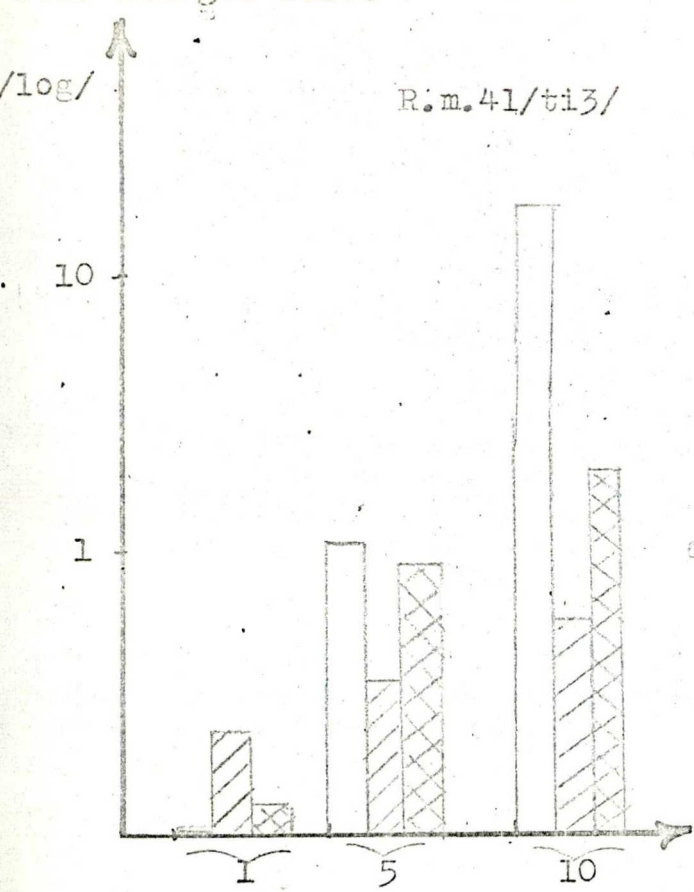
7.5. A ti mutánsok immunitásának vizsgálata

Az előző vizsgálatokból kitűnt, hogy a 16-3 és a 36 fág regulátor génje azonos, így a hibás represszort termelő 36 fágmutánsok jellemzéséhez felhasználhattuk a 16-3 fág virulens /operátor/ mutánsait. A vizsgálatot a ti mutánsokkal lizogenizált sejtek virulens mutánsal való felülfertőzésével végeztük el. Homoimmunis fágok esetén a baktériumsejtben levő represszormolekulák meggátolják a felülfertőző fágok szaporodását. A virulens fágok azonban nem érzékenyek a represszorra, ezért ezek lizogén baktériumon is képesek bizonyos mértékű szaporodásra. A virulencia az operátor gén mutációjának következménye; az operátor lokusz represszor kötő helyének bázisszekvenciája változik meg, oly módon, hogy a represszor molekulát nem vagy csak csökkent mértékben képes megkötni. Kísérleteinkben a w1, w2 /Orosz L./ és 24/4 /Dallmann G./ jelzésű virulens fággal fertőztük felül a 36ti mutánsokkal lizogenizált baktériumot, oly módon, hogy a virulens fág multiplicitását változtattuk /m.o.i.=1; 5 ill. 10/. A kísérletek kiértékelésénél a felülfertőzött baktérium populáció átlagos fághozamát vettük figyelembe. A vad típusu, 16-3 fággal lizogenizált baktérium volt az egyik, amíg a 16-3 ti3 mutánsal lizogenizált baktérium volt a kísérlet másik kontrollja, amelyekhez az izolált ti mutánsok érzékenysége viszonyítható. Az adatokat a 6. táblázatban tüntettük fel, ahol a relatív átlagos burst a lizogén baktériumként kiszabaduló fágok számát jelenti.

Lizogén baktérium virulens fág/m.o.i.		/ti3/	/ A1 /	/ A2 /	/ B2 /	/ B3 /	/ B4 /	/ B6 /	/ 16-3 /
w 1	1	0,093	2,31	0,34	4,74	0,077	0,101	0,265	0,061
	5	1,24	24,31	2,85	6,0	4,24	4,44	3,50	-
	10	15,40	70,60	18,84	27,64	31,59	21,44	66,34	0,63
w 2	1	0,24	3,04	0,80	1,55	0,04	0,04	2,73	0,026
	5	0,306	8,90	7,73	10,91	11,06	0,77	10,15	-
	10	0,57	58,80	33,85	11,80	11,98	1,27	45,48	0,074
24/4	1	0,123	1,54	0,04	4,56	0,04	0,04	2,88	0,036
	5	0,87	9,23	6,31	8,45	5,53	1,89	18,49	-
	10	1,81	27,1	8,50	12,7	14,1	11,7	32,24	0,193

6. táblázat : az adatok a relativ átlagos burst értékeket jelentik

rel. átlagos burst



3/a. ábra : lizogén baktériumok felülfertőzése virulens fággal

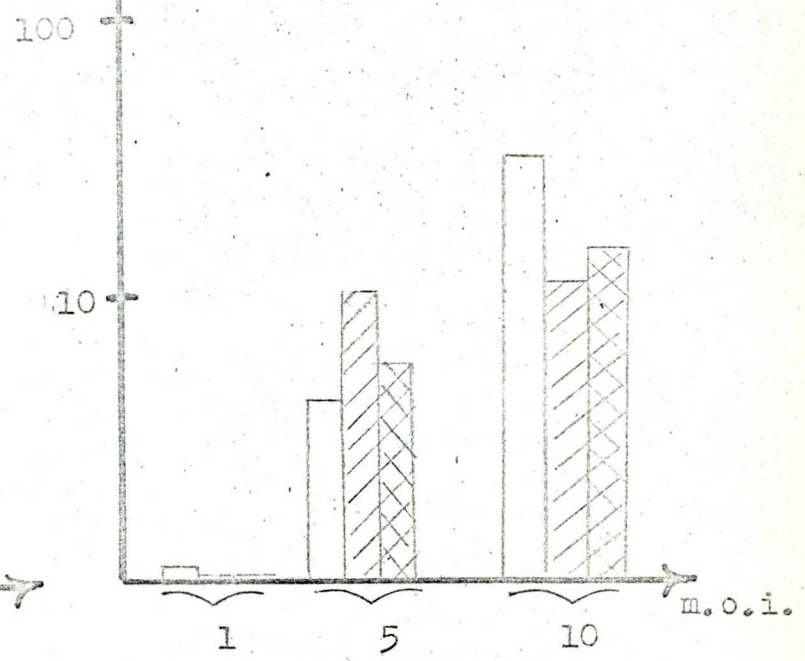
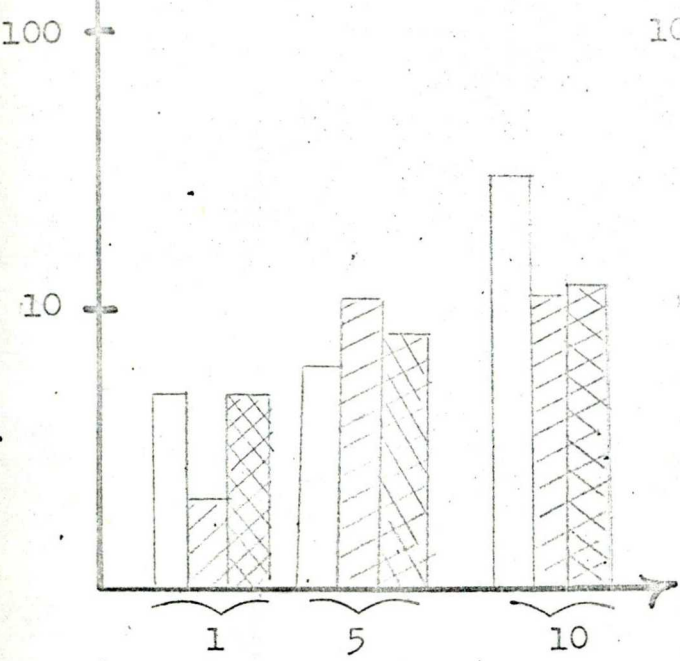
w1
 w2
 24/H

rel. átlagos burst

/log

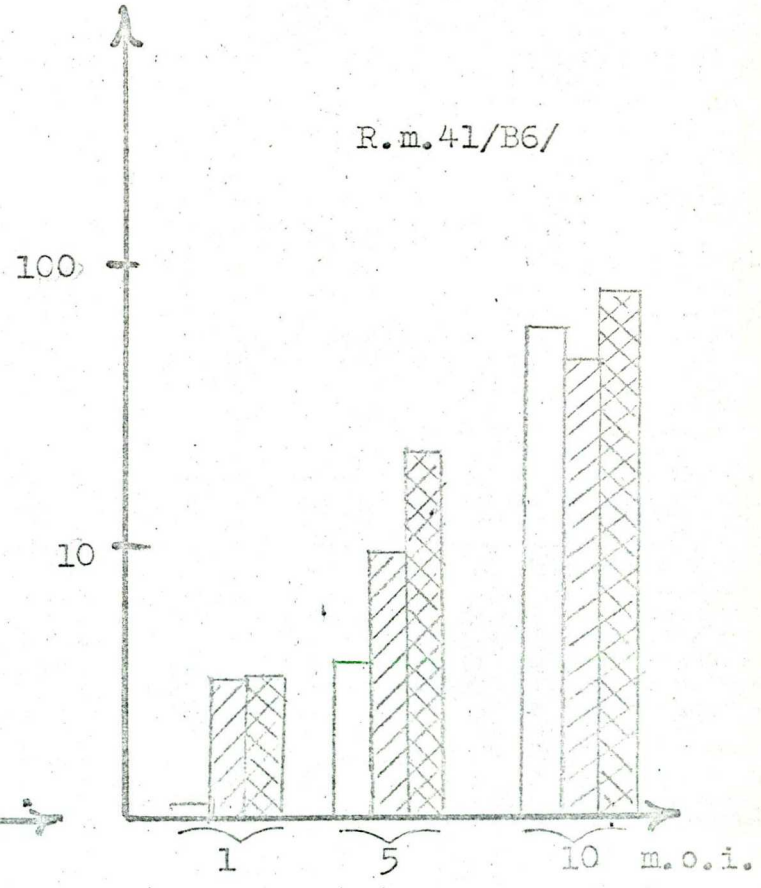
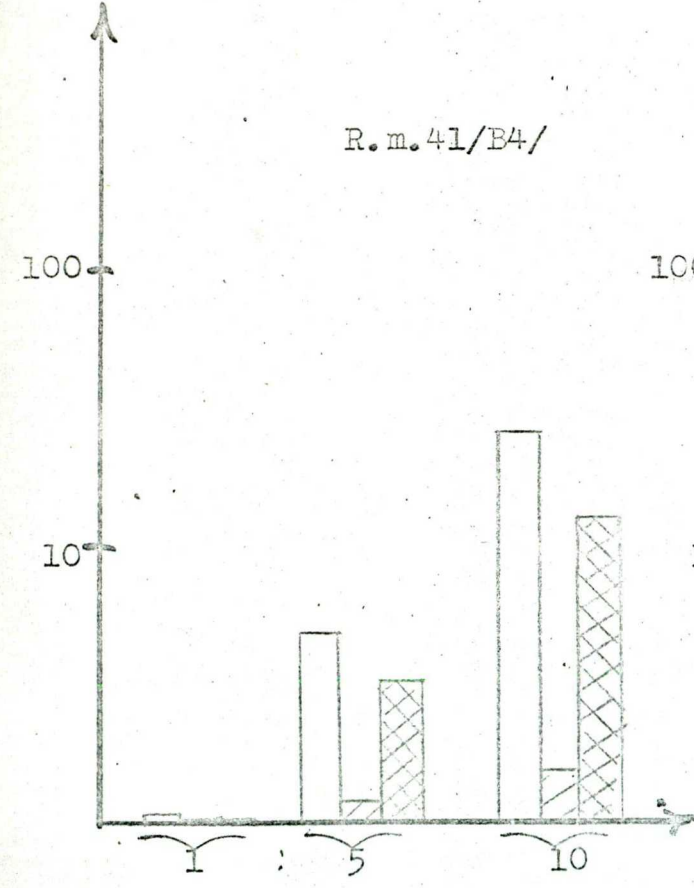
R.m.41/B2/

R.m.41/B3/

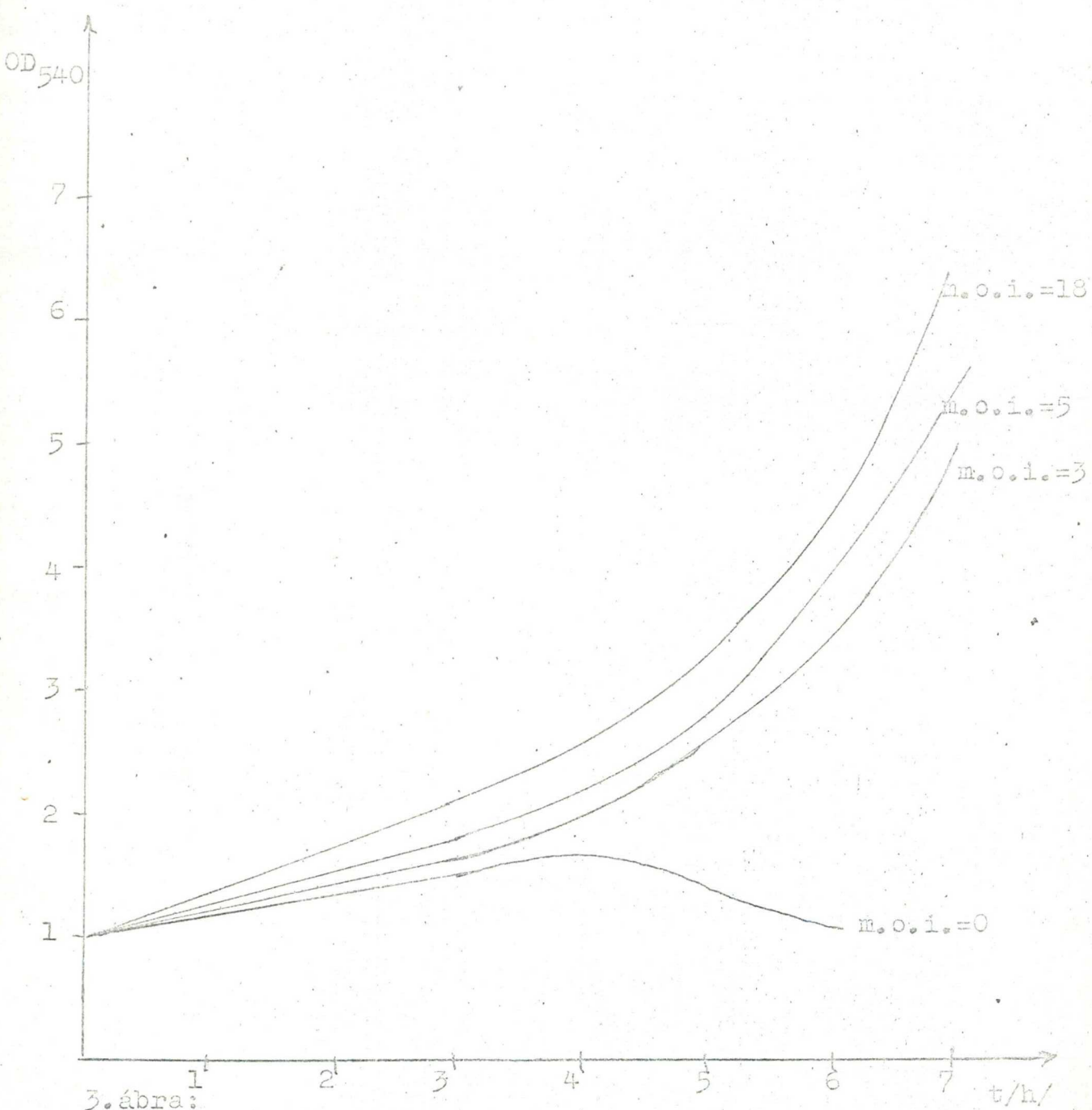


R.m.41/B4/

R.m.41/B6/



3/b . ábra : lizogén baktérium felülfertőzése virulens fággal



3. ábra:

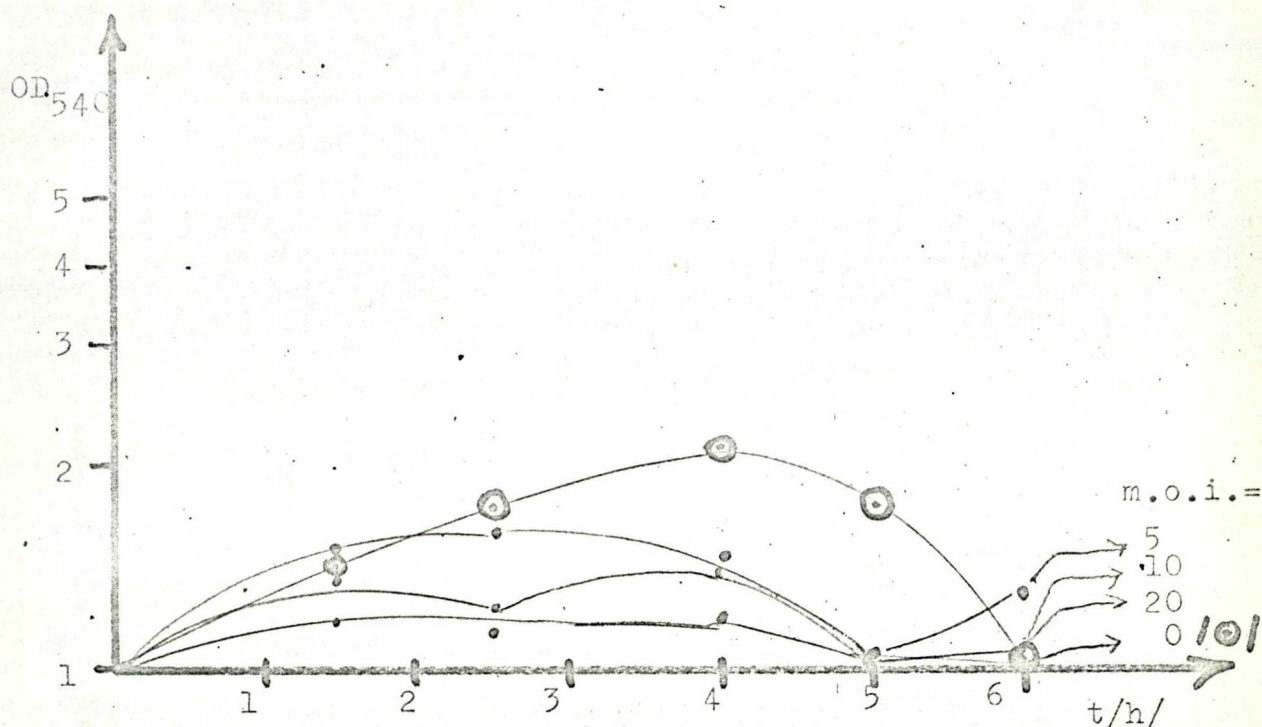
R.m.41/ti5/ lizogén baktérium és B6 fág komplementációjának időbeli változása - különböző multiplicitással történő felülfertőzés esetén

A 3/a és 3/b ábrán és a táblázat adataiból is jól látható, hogy a *ti* mutáció minden esetben megnöveli a sejtek érzékenységét a virulens fággal szemben. A különböző *ti* mutációk nem azonos módon viselkednek a felülfertőző virulens fágokkal szemben, aminek egyrészt oka a *w1*, *w2* és 24/4 különbözősége, másrészt a *ti* mutánsok eltérő érzékenysége /pl.: B6 és A1 kiemelkedő érzékenysége/.

7.6. A 36 fág *ti* mutánsainak komplementációs vizsgálata

A *ti* mutánsok funkcionális vizsgálatát komplementációval kíséreltük meg. A csepp-komplementációs eljárással kapott eredmény alapján a mutánsok semmilyen kombinációban sem komplementálnak, ami megfelel annak, hogy az összes *ti* mutáns egy cisztronba /C gén/ tartozik /ugyanazt az eredményt adta a Levine-féle eljárás is/. Az *E. coli* λ fágjánál azonban leírtak egy olyan eljárást, ami lehetőséget nyújt az inter-allélikus komplementáció kimutatására, ill. figyelembe veszi a lizogénia jelenségének összetettségét. Ebben az esetben a komplementáció kimutatása azon alapszik, hogy a lizogén baktérium életben maradása jóval érzékenyebb mérőszám, mint a lizogén állapot kialakítása. Olyan körülmények között, amikor a baktériumsejt citoplazmájában mindkét hőérzékeny represszor jelen van és magas hőmérsékleten mégsem következik be a lizogén baktérium indukciója, azt állíthatjuk, hogy a két mutáns fág komplementál - együttesen képesek a lizogén állapot fenntartására.

A 3. és a 3/A. ábrán látható azon vizsgálatok eredménye, amelyeknél a komplementáció és a felülfertőző fág multiplícitásának viszonyát néztük.



3/A. ábra R.m.41/ti3/ lizogén baktérium és B6 fág komplementációjának időbeli változása - különböző multiplícitással történő felülfertőzés esetén

A komplementációs vizsgálatot úgy végeztük, hogy minden heterológ szuperinfekcióhoz mindkét fág homológ szuperinfekciója szolgált kontrollként. A lizogén baktériumnak a profággal azonos fággal való felülfertőzését homológ, eltérővel való felülfertőzését pedig heterológ szuperinfekciónak nevezzük. Az adatokat a 7/a és 7/b táblázat tartalmazza.

A 8. táblázatban összefoglaltuk a komplementációs vizsgálatok eredményét. Látható, hogy a komplementáció bizonyos

R.m. 41/A1/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,01	1,30	1,02	1,03	0,92	1,95	1,41
4	1,46	0,89	1,03	0,60	0,56	1,81	1,24
5	1,06	0,76	0,97	0,58	0,52	1,17	1,59
6	0,80	0,82	0,69	0,63	0,53	1,01	1,81

R.m. 41/A2/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,31	1,42	1,34	2,65	3,26	1,34	2,06
4	1,57	1,44	1,33	5,14	6,68	1,49	2,37
5	1,99	2,04	2,02	9,59	12,41	2,00	3,17
6	2,73	1,32	2,82	15,7	19,8	3,06	3,82

R.m. 41/B2/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	0,50	0,93	1,16	1,24	1,06	1,47	1,60
4	0,64	0,98	1,19	1,62	1,66	1,84	2,07
5	0,73	1,14	1,02	-	-	2,51	2,86
6	0,80	1,24	0,96	2,79	2,68	3,11	3,70

R.m. 41/ti3/ /ti4/ /ti5/

t /h/	ti4	ti5	ti3	ti5	ti3	ti4
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,52	1,41	1,77	1,68	1,19	1,09
4	0,95	1,07	0,96	1,10	0,89	0,96
5	0,46	0,43	0,52	0,49	0,58	0,71
6	0,48	0,50	0,56	0,54	0,64	0,70

7/a. ábra : komplementációs vizsgálatok összefoglaló táblázatai

/ az adatok a t=0 időpontra vonatkoztatott relatív OD₅₄₀ értékek /

R.m. 41/B3/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,25	1,10	1,35	1,35	1,24	2,12	1,37
4	1,59	1,52	1,20	1,62	1,96	1,95	1,30
5	-	-	-	1,14	-	1,76	-
6	1,43	1,44	1,34	1,02	1,52	-	0,91

R.m. 41/B4/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,41	1,05	1,15	1,09	1,21	2,02	1,71
4	1,80	1,74	1,20	1,31	1,41	1,62	1,85
5	-	-	-	-	2,25	1,31	2,01
6	1,47	1,42	0,98	1,06	1,75	-	2,82

R.m. 41/B6/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	0,89	1,34	1,05	1,42	0,95	1,40	1,65
4	0,51	1,49	0,94	1,05	1,14	1,66	1,97
5	0,81	1,25	0,80	0,97	0,92	1,76	2,26
6	0,79	0,91	0,85	0,79	0,81	1,02	2,48

R.m. 41/ti3/

t /h/	A1	A2	B2	B3	B4	B6	ti3
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,17	1,12	1,10	1,19	1,11	1,60	1,98
4	1,44	1,15	1,16	1,71	1,42	1,36	2,02
5	1,70	1,27	1,34	-	-	0,75	1,83
6	1,35	1,40	1,52	2,00	1,54	0,86	0,71

fág baktérium	B6	A2	B4	B3	B2	A1	t13
/B6/	0	▨	0	0	▨	0	▨
/A2/	▨	0	▨	▨	+	▨	+
/B4/	0	▨	0	0	0	0	+
/B3/	0	▨	0	0	0	0	▨
/B2/	▨	0	+	+	0	0	+
/A1/	0	▨	0	0	0	0	+
/t13/	▨	+	+	▨	+	+	0

8. táblázat : Komplementációs vizsgálatok összefoglalása

+ = van komplementáció

0 = nincs komplementáció

▨ = eltérés a reciprok tesztben

esetekben un. pozíció-effektust mutat, tehát függ attól, hogy melyik mutáns a profág és melyik a felülfertőző fág.

8. Eredmények megbeszélése és következtetések

Rhizobium meliloti 41 baktérium 36 jelzésű fágjának C /regulátor/ génjében NTG kezelés után $1,08 \cdot 10^{-3}$ gyakorisággal indukálódik olyan mutáció, amelynek hatására a represszor fehérje hőérzékenyvé válik. Szelekciós technikánkból következik, hogy ezeknek a gén olyan pontjait kell érinteniük, amelyek a lizogén állapothoz szükséges térszerkezet funkcionálisan többé-kevésbé fontos részét érintik.

A fehérje hőérzékenységének egyik jellemzője a kritikus hőmérséklet, tehát az a hőfok, ahol a represszor fehérje már - térszerkezetének megváltozása miatt - nem képes biztosítani a lizogén állapot fennmaradását. A 36 fág ti mutánsai esetében azt tapasztaltuk, hogy a kritikus hőmérséklet 32°C volt az A2, B2, B6; 34°C az A1 és 36°C a B3 és B4 mutáns esetében. Azonban ezeken a kategóriákon belül is felállíthatunk egy érzékenységi sorrendet, ami a tényleges viszonyokat jobban tükrözi, de hátránya, hogy a kiértékelés vizuálisan történik, tehát bizonyos mértékig szubjektív. Összehasonlításképpen érdemes a 16-3 fág ti mutánsait is elhelyezni a sorozatban:

B6 > B2 > A2 > ti4 ; A1 > ti3 ; ti5 > B3 > B4

A genetikai térképezéshez a 16-3 fágból izolált, C génben

deléciós mutánsokat használtuk fel. Ezek segítségével a mutációk a regulátor gén egy-egy szegmentjéhez rendelhetők. A deléciós rekombinációs analízis is egyik bizonyítéka annak, hogy a két fág regulátor génje homológ, vagy az eltérés annyira csekély és funkcionálisan lényegtelen, hogy ilyen módon nem mutatható ki. A kapott eredményeket összehasonlítva a 16-3 fággal, azt tapasztaltuk, hogy a ti5 mutáns azonos szegmentben helyezkedik el mint a 36 fágból izolált B3 és B4 jelzésű mutáns, sőt hőindukciós jellemzőik is 36°C-on megegyeznek. A ti3 mutánssal azonos szegmentbe térképeződik az A1 és szintén azonos - 34°C-on - indukálódnak. A ti4 mutánssal azonos szegmentbe térképeződik a B2 mutáns és mindkettő kritikus hőmérséklete 32°C, de érdekes módon az ebbe az indukciós osztályba tartozó másik két mutáns, a B6 és az A2 ettől eltérően a C gén bal szélére térképeződik. Ennek a két mutánsnak a térképezéséhez felhasználtunk kettős mutánsokat is /ti4-sp4; ti4-sp3; ti4-U6/, mert nem rendelkezünk megfelelő deléciókkal. A fenotípus, a hőérzékenység és a mutációk térkép-helyzetének összevetése után megállapíthatjuk, hogy ezek között korreláció van; meghatározott részen bekövetkezett mutáció hasonló hőérzékenységhez és fenotípushoz vezet. Ez alól azonban kivételt képeznek azok a mutációk, amelyek a gén "elejét" - bal szélét érintik, tehát esetünkben az A2 és B6.

Az ilyen módon jellemzett ti mutánsainkat felhasználtuk arra, hogy belőlük kettős /ti-ti/ mutánsokat hozzunk létre. Ezek fenotípusának a 16-3 fágnál végzett vizsgálatok alapján tiszta tarfoltuaknak kell lenniük. Az ilyen fágok szerkezetét deléciós rekombinációs analízissel igazoltuk és felhasználtuk

a ti mutánsok kritikus hőmérsékletének különbözőségét is. A kapott eredményekből leszűrhetjük, hogy a két ti mutáció együttes előfordulása ugyanazon a fágkromoszómán a represszor fehérje teljes inaktiválódását jelenti. Néhány kombinációban azonban a várt eredménytől eltérően a keresztezés utódai között nem találtunk mutáns fenotípusot. Ezekben a keresztezésekben az egyik szülő mindig a B6 jelzésű mutáns volt, ami ennek a mutációnak a különleges szerepére mutat. Térképhelyzete alapján - és más vizsgálatokból is feltehető, hogy ez, a C gén bal széléről átiródó molekuláris /C-terminális/ bizonyos működésbeli autonómiával rendelkezik és kitüntetett szerepet játszik a regulációs funkció megvalósításában.

A lizogén baktériumok immunitásának vizsgálatát a 16-3 virulens mutánsaival való felülfertőzéssel oldottuk meg. Az immunitási anyag hatékonyságának megváltozását egyrészt a vad típusu /16-3/ fággal, másrészt ennek ti3 mutánsával lizogénizált baktériumhoz viszonyítottuk. Vizsgálataink alapján megállapíthatjuk, hogy a 36 fág C génjében bekövetkezett ti mutáció a w1, w2 és 24/4 jelzésű fággal szemben való ellenállóképességet lecsökkentette, tehát a felülfertőző fág multiplícitásának függvényében kevésbé volt immunis, mint a vad típusu fággal lizogénizált baktérium. Ebben az esetben is a C gén bal szélén bekövetkezett B6 mutáció okoz erőteljes immunitás csökkenést, de érdekes módon ebben az esetben igen érzékeny az A1 mutáns is, ami viszont térképhelyzetét tekintve a C gén jobb szélén helyezkedik el. Ezek alapján fel kell tételeznünk, hogy az ezeknek a régióknak megfelelő molekuláris részek szerepet játszanak a represszor DNS-hez való kapcsolódásában.

Az izolált ti mutánsok funkcionális vizsgálatát komplementációs analizissel végeztük el. A "hagyományos"-Levine és Kaiser féle komplementációs eljárás ebben az esetben is negatív eredményt adott, a 16-3 ti mutánsaihoz hasonlóan, illetve azt mutatta, hogy a regulátor gén egyetlen cisztron. Ezekon kívül azonban elvégeztünk egy olyan komplementációs vizsgálatot, amely lehetőséget nyújt a génen belüli, interallélikus komplementáció vizsgálatára. Ennek az eljárásnak másik előnye, hogy figyelembe veszi a lizogén funkció összetettségét, és nem annak kialakulását, hanem fennmaradását mutatja ki. Így sikerült megállapítanunk, hogy a 36 fág C génjének terméke esetenként komplementálhatja egymást. A komplementáció azonban un. pozíció-effektust mutatott, azaz eltérést tapasztaltunk attól függően, hogy melyik mutáns volt a profág és melyik a felülfertőző. Ebben az esetben a gén bal szélén levő mutációk /B6 és A2/ mutatták ezt a jelenséget, ami szintén alátámasztja azt a feltevést, hogy a represszor fehérje C-terminális része funkcionálisan igen jelentős.

Összefoglalás

Az értekezésben a Rhizobium meliloti 36 jelzésű temperált fág hővel indukálható, regulátor gén mutánsainak vizsgálatáról számoltunk be. A kísérletek eredményei és a belőlük levonható következtetések az alábbiakban foglalhatók össze:

A mutáns represszorok hőérzékenységük alapján osztályozhatók, sőt, az egyes osztályokon belül is felállíthatunk egy érzékenységi sorrendet.

A mutációk térképhelyzete és a represszor hőérzékenysége között korreláció van, ez alól a C gén elején bekövetkezett mutációk képeznek kivételt, ezek fokozott hőérzékenységet mutatnak.

A kettős ti mutánsok vizsgálatából megállapítható, hogy a regulátor gén adott helyén bekövetkezett mutáció /B6/ autonóm módon nyilvánul meg, ami az érintett molekuláris működésbeli autonómiájára utal.

A ti mutánsokkal lizogenizált baktériumok immunitásának vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy a vad típusu fágokhoz viszonyítva minden esetben csökkent az immunitás. Fokozott immunitás csökkenést két esetben tapasztaltunk: a B6 mutáns esetében, ami a C gén bal szélére és az A1 mutáns esetében, ami viszont a C gén jobb szélére térképeződik.

A 36 fág ti mutánsai esetében kimutatható a C cisztronon belüli, tehát interallélikus komplementáció speciális esete, amikor a működés kiegészítés a már kialakult lizogén állapot fenntartásában nyilvánul meg.

Összegezésül megállapíthatjuk, hogy korreláció van a mutáció térképhelyzete, a mutáns hőérzékenysége, immunitás változása, illetve komplementációs képessége között. Az immunitás szempontjából ki kell emelni a regulátor gén két szélére térképeződő mutánsok fokozott érzékenységét, inter-allélikus komplementáció szempontjából pedig a regulátor gén bal szélén bekövetkezett mutációk által okozott viselkedést, ami feltétlenül további - elsősorban biokémiai - vizsgálatokat igényel.

Irodalomjegyzék

1. Aoni, Junko., T.Horiuchi, 1977: Purification and some properties of presumptive product of coli-phage 434. Molec. Gen. Genet. 156, 195-201.
2. Belfort, Marlene, N., Kass, A. Oppenheim, N.Katzir, A.B.Oppenheim, 1977: Repressor and Int. Synthesis of bacteriophage λ in the E.coli host mutant ER 437. Molec. Gen. Genet. 155, 347-349.
3. Bertani, G., 1968: Prophage attachment and detachment: Comparison of phages P2 and λ . Molecular Genetics, Springer Verlag, Berlin.
4. Bourgeois, S., A.Jobe 1970: The lactose operon. Cold Spring Harbor, New York
5. Brack, C., V. Pirota, 1975: Electron Microscopic study of the repressor of bacteriophage λ and its interaction with operator DNA. J. Mol. Biol. 96, 139-152.
6. Calendar, R., G.Lindhal, M.Marsh, M.Sunshine, 1972: Temperatura-inducible mutants of P2 phage. Virology, 47, 68-75.
7. Campbell, J.H., B.G. Ralpi, 1975: Evidence for a dual control of the initiation of host-cell lysis caused by phage lambda. Molec. gen. Genet. 139, 1-8.
8. Court, D.L. Green, H.Eshols, 1975: Positive and negativ regulation by the cII and cIII gene products of bacteriophage λ . Virology, 63, 484-491.
9. Dallmann G., 1977: 16-3 fág virulens mutánsának genetikai analizise, Diplomadolgozat, Szeged.

10. Davison, J., 1973: Positive and negative control of transcription in bacteriophage λ . Br. med. Bull. 29,/3 208-213.
11. Deák F., 1974: Egy bakteriofág regulátor génjének elemzése. Diplomadolgozat, Szeged.
12. Echols, H., 1972: Developmental pathways for temperate phage: lysis vs. lysogeny. Ann. Rev. Genet. 6, 157-190.
13. Eisen, H., Brachet, P., Pereira Da Silva, L., Jacob, F., 1970: Regulation of repressor expression in λ . Proc. nat. Acad. Sci. 66, 855-862.
14. Freifelder, D., E. Levine, 1975: The formation of polylysogenes during infection of E.coli with bacteriophage λ . Virology, 63, 428-437.
15. Gough, Michael; Shin-Ichi Tokuno, 1975: Further structural analogies between the repressor regions of phages P22 and λ . Molec.gen.Genet. 138, 71-79.
16. Highton, P.J., M. Whitfield, 1975: Similarities between the DNA molecules of bacteriophages 424, λ , and 21, determined by denaturation. Virology, 63, 438-446.
17. Honigman, A., S.-L. Hu., R. Chase, W. Szybalski, 1976: 4S_{oop} RNA is a leader sequence for the immunity - establishment transcription in coli phage. Nature, 262, 112-115.
18. Honigman, A., A. Oppenheim, A.B. Oppenheim, 1975: A pleiotropic regulatory mutation in λ bacteriophage. Molec.gen.Genet. 138, 85-111.

19. Jacob, F., E.L. Wollman: Symp.Soc.Exptl.Biol. 12, 75.
20. Kondorosi, Á., L.Orosz, Z.Sváb, T.Sik, 1974: Genetic studies on Rhizobiophage 16-3 II. Molec.gen.Genet. 132, 153-163.
21. Levine, M.C., Schott, 1971: Mutations of phage P22 affecting phage DNA synthesis and lysogenization. J. Mol. Biol. 62, 53-64.
22. Lieb, M., 1966: Studies of heat-inducible lambda bacteriophage I. Order of genetic sites and properties of mutant prophages. J. Mol. Biol. 16, 149-163.
23. Lieb, M., 1969: Allosteric properties of the λ repressor J. Mol. Biol. 39, 379-382.
24. Lieb, M., 1976: λ cI mutants: intragenic complementation and complementation with a cI promoter mutants Molec. gen. Genet. 146, 291-297.
25. Maniatis, Tom, A., Jefferey, D.G. Kleid, 1975: Nucleotide sequence of the rightward operator of phage . 72/3, 1184-1188.
26. Maniatis, T., M. Ptashne: 1976: A DNA operator-repressor system. Scientific American 234/1, 64-76.
27. Mount, D.W., 1977: A mutant of E.coli showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways. Proc.nat.Acad.Sci. 74, 300-304.
28. Muratsu, T., H.Tanaka, M.Imaji, H.Koga, K.Matsuharu, T.Horiuchi, 1977: Purification and properties of a λ operator-binding protein which is expected to be autorepressor /tof protein/ from E.coli

- carrying λ dv Plasmid. Molec. gen.Genet. 157,
139-147.
29. Oppenheim, Ariella, 1977: Suppression of a P_{rm} mutant
by the sar mutation for the synthesis of repressor
by bacteriophage lambda. J. Mol. Biol. 111, 83-89.
30. Orosz, L. 1969: Egy bakteriofág genetikai térképezése.
egyetemi doktori értekezés, Budapest.
31. Orosz, L., 1971: Genetic mapping of regulator gene of phage
16-3 of Rhizobium meliloti. Bacterial plasmids and
Antibiotic resistance, International Symposium, 1971.
32. Orosz, L., T.Sik, 1970: Genetic mapping of Rhizobiophage
16-3. Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 17, 185-194.
33. Orosz L., 1972: Bakteriofág kromoszóma genetikai elemzése.
Kandidátusi értekezés, Szeged.
34. Orosz, L., Z.Sváb, Á.Kondorosi, T.Sik, 1973: Genetic
studies on Rhizobiophage 16-3 I. Genes and function
on the chromosome. Molec.gen.Genet. 125, 341-350.
35. Ürdögh F., K.Szende, 1961: Temperate bacteriophages isolated
from Rhizobium meliloti. Acta Microbiol. Hung.
VIII. 65-71.
36. Ptashne, M., K.Beckman, M.Z. Humayer, A.Jeffers, R.
Manner, B.Meyer, R.T. Saner, 1976: Autoregulation
and function of a repressor in bacteriophage λ .
Science 194/4261, 156-161.
37. Roberts, J.W., C.W. Roberts, 1975: Proteolytic cleavage of
Bacteriophage lambda repressor in induction. Proc.
nat.Acad.Sci. 72/1, 147-151.
38. Rostás, K., 1977: A 16-3 fág C génjének térképezése
belső viszonyító kontrollal, Diplomadolgozat, Szeged

39. Sadler, J.R., T.F. Smith, 1971: Mapping of the lactose operator. *J.Mol.Biol.* 62, 139-169.
40. Shinagawa, H., T. Itah, 1973: Inactivation of DNA-binding activity of repressor in extracts of λ -lysogen treated with mitomycin C. *Molec.gen.Genet.* 126, 103-110.
41. Shinagawa, H., K. Miruchi, P.T. Emmerson, 1977: Induction of prophage lambda by γ -rays, Mitomycin C and tif: Repressor cleavage studied by immunoprecipitation. *Molec.gen.Genet.* 155, 87-91.
42. Sik, T., L. Orosz, 1971: Chemistry and Genetics of *Rhizobium meliloti* phage 16-3. *Plant and Soil*, Special Volume 57-62.
43. Stevens, W.F., 1975: A pleiotrophic regulatory mutation in Bacteriophage. *Molec.gen.Genet.* 138, 85-111.
44. Wulff, D., L., 1976: Lambda cin-1, a new mutations which enhances lysogenization by bacteriophage lambda, and the genetic structure of the lambda cy region. *Genetics* 82, 401-416.
45. Yamamoto, N., N. Ushijima, P. Genski, L.S. Baron, 1977: Genetic studies of hybrids between coli phage and *Salmonella* phage P22: Genetic analysis of the P22- λ Hybrid Class, *Molec.gen.Genet.* 155, 117-121.

39. Sadler, J.R., T.F. Smith, 1971: Mapping of the lactose operon. *Mol. Biol.* 62, 139-169.
40. Shinagawa, H., T. Itah, 1973: Inactivation of DNA-binding activity of repressor in extracts of λ -lysogen treated with mitomycin C. *Molec.gen.Genet.* 126, 103-110.
41. Shinagawa, H., K. Miruchi, P.T. Emmerson, 1977: Induction of prophage lambda by γ -rays, Mitomycin C and tif: Repressor cleavage studied by immunoprecipitation. *Molec.gen.Genet.* 155, 87-91
42. Sik, T., L. Orosz, 1971: Chemistry and Genetics of *Rhizobium meliloti* phage 16-3. *Plant and Soil*, Special Volume 57-62.
43. Stevens, W.F., 1975: A pleiotropic regulatory mutation in Bacteriophage. *Molec.gen.Genet.* 138, 85-111.
44. Wulff, D., L., 1976: Lambda cin-1, a new mutations which enhances lysogenization by bacteriophage lambda, and the genetic structure of the lambda cy region. *Genetics* 82, 401-416.
45. Yamamoto, N., N. Ushijima, P. Genski, L.S. Baron, 1977: Genetic studies of hybrids between coliphage and Salmonella phage P22: Genetic analysis of the P22- λ Hybrid Class, *Molec.gen.Genet.* 155, 117-121.

Rövidítések

R.m.41 = *Rhizobium meliloti* 41 baktériumtörzs

R.m.41/16-3/= 16-3 fággal lizogenizált R.m.41

ti= "thermo-inducible" = hővel indukálható

C; CI; CII; CIII = regulátor gének jelölése

O_L; O_R = bal ill. jobb oldali operátor régiók

P_L; P_R = bal ill. jobb oldali promoter régiók

m.o.i.= a fertőzés multiplicitása /=multiplicitás/

OD₅₄₀ = 540 nm-n mért optikai denzitás

$$\text{rel OD} = \frac{\text{OD}_{t=x}}{\text{OD}_{t=0}}$$

§ faktor = a fehérjeszintézishez nélkülözhetetlen fehérje

λ = az *Escherichia coli* temperált fágja

P22 = a *Salmonella typhimurium* temperált fágja

P2 = *Escherichia coli* fágja

Δ; A, = deléció mutáns jelzése

ts = "thermo-sensitive" = hőérzékeny

U: UV-vel indukált R.m.41. 16-3 mutánsok

sp: spontán R.m.41 16-3 mutánsok

A dolgozat alapjául szolgáló kísérleteket a József Attila Tudományegyetem Genetikai Tanszéki Csoportjánál végeztem, dr. Orosz László irányításával.

Köszönettel tartozom a Csoport minden dolgozójának, akik értékes elméleti tanácsaikkal és gyakorlati segítségükkel hozzájárultak munkám elvégzéséhez. Ezenkívül köszönettel tartozom az MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet Nukleinsav Csoport és a Biofizikai Intézet Elektronmikroszkóp laboratórium munkatársainak segítőkészségükért.

