

AZ *ESCHERICHIA COLI murI* GÉN HIÁNYÁNAK, ILLETVE FOKOZOTT
AKTIVITÁSÁNAK FENOTIPIKUS HATÁSAI

Egyetemi doktori értekezés

Balikó Gabriella

Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézet

Szeged

1994

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetem fejezem ki Venetianer Pálnak, témavezetőmnek, munkám feltételeinek és az önálló kísérletezés lehetőségének biztosításáért. Hálás vagyok Boros Imrének, akitől a munkám kezdeti szakaszában sokat tanultam és sok támogatást kaptam. Köszönöm Anton Józsefnének a magas színvonalú, gondos asszisztensi segítséget. Köszönetemet fejezem ki Katonáné Lehoczki Klárának, aki rövid ideig szintén technikai segítséget nyújtott, és Magyaródi Erzsébetnek, aki kezdő kutató koromban bevezetett a laboratóriumi ismeretekbe.

Köszönetet mondok mindazoknak, akik érdeklődéssel, tanácsokkal segítettek. Köszönöm Fodor Katalinnak és Udvardy Andornak az értekezésre vonatkozó hasznos észrevételeket.

Köszönöm Dr Mucsi Imrének, hogy a kecske-immunizálás során az injekciózásokat és a vérvételeket elvégezte, és a kecsketartás feltételeit biztosította.

Köszönöm Hadlaczky Gyulának a fluoreszcens mikroszkópos fotózásban nyújtott türelmes segítségét.

Köszönöm Dora Choli-nak (Berlin, Max Planck Intézet) a P31 protein N-terminális szekvenciájának meghatározását.

Köszönöm Tóth Máriának és Borka Andrásnak az ábrák gondos elkészítését, készséges együttműködésüket.



A dolgozatban alkalmazott rövidítések jegyzéke

Ap: ampicillin

bp: bázispár

Cm: kloramfenikol

BSA: marha szérumalbumin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DTT: ditiotreitól

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

IPTG: izopropil-1-thio- β -D-galaktóz

kb: kilobázispár

Km: kanamicin

NAcGlc: N-acetilglukózamin

NAcMur: N-acetilmuraminsav

ORF: open reading frame, nyitott leolvasási sor

PAGE: poliakrilamid-gélelektroforézis

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

SDS: nátrium-dodecil-szulfát

Tc: tetraciklin

TCA: triklórecetsav

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

Tris: trisz-hidroximetil-amino-metán

UP-víz: ioncserélt (ultrapure) víz

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldalszám
I. BEVEZETÉS	1.
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
III. CÉLKITŰZÉSEK	12.
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	14.
IV.1. Vegyszerek, preparátumok, baktériumok, plazmidok	14.
IV.1.1. Vegyszerek, izotópok	14.
IV.1.2. Enzimpreparátumok	14.
IV.1.3. Táptalajok, antibiotikumok	14.
IV.1.4. Baktériumtörzsek és plazmidok	15.
IV.2. A kísérleti módszerek leírása	17.
IV.2.1. Plazmid-izolálás <i>E. coliból</i>	17.
IV.2.2. Össz-DNS-preparálás <i>E. coliból</i>	17.
IV.2.3. <i>E. coli</i> transzformáció	18.
IV.2.4. DNS-fragmentumok méret szerinti elválasztása gélelektroforézissel	19.
IV.2.5. Plazmidok topológiai állapotának vizsgálata agaróz gélelektroforézissel	20.
IV.2.6. DNS-fragmentum-izolálás agaróz gélből	20.
IV.2.7. DNS-emésztés restrikciós endonukleázokkal, DNS-restrikciós fragmentumok ligálása, DNS-végfeltöltés Klenow-polimerázzal	21.

IV.2.8. DNS <i>in vitro</i> radioaktív jelölése	21.
IV.2.9. Southern transzfer és hibridizáció	21.
IV.2.10. Fehérjék molekulásúly szerinti szétválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel	22.
IV.2.11. Fehérjék kétdimenziós gélelektroforézise	22.
IV.2.12. A P31 fehérje izolálása <i>E. coliból</i> oszlopkromatográfiás módszerekkel	23.
IV.2.13. Fehérje natív molekulásúly meghatározása méret-kizárásos kromatográfiával	26.
IV.2.14. Fehérjekoncentráció-meghatározás	27.
IV.2.15. Kecse immunizálása <i>E. coliból</i> izolált fehérjével	27.
IV.2.16. Immunprecipitáció	28.
IV.2.17. Fehérjék <i>in vivo</i> radioaktív jelölése	29.
IV.2.18. Fehérjékbe épült radioaktivitás meghatározása	29.
IV.2.19. <i>E. coli</i> sejt-és nukleoid-alak vizsgálata fénymikroszkóppal	29.
V. A KÍSÉRLETEK LEÍRÁSA	31.
V.1. A P31 protein túltermeltetése, izolálása <i>E. coliból</i> és anti-P31 ellenanyag előállítása	31.
V.1.1. Az ORF1 beépítése expressziós vektorokba	31.
V.1.1.1. A pER235ORF plazmid konstrukciója	32.
V.1.1.2. A pER23CHORF plazmid konstrukciója	35.
V.1.1.3. A pKKORF plazmid konstrukciója	36.

V.1.1.4. Az ORF1 gén intenzív transzkripcióját biztosító rekombináns plazmidok összehasonlítása	36.
V.1.2. A P31 protein izolálása <i>E. coliból</i>	40.
V.1.2.1. A P31 protein részleges tisztítása HB101 (p418-23) sejtekből	40.
V.1.2.2. A P31 protein izolálása pER235ORF vagy pER23CHORF plazmiddal transzformált <i>E. coliból</i>	42.
V.1.3. A P31 protein natív molekulásúlyának megállapítása	45.
V.1.4. Poliklonális anti-P31 ellenanyag termeltetése kecskében	46.
V.2. Az ORF1 gén inaktiválása a kromoszómán és a mutánsok fenotípusa	48.
V.2.1. Kísérletek az ORF1 gén inaktiválására	48.
V.2.1.1. Kanamicin-rezisztencia gént hordozó fragmentum inszerciója a p418-23 plazmidon lévő ORF1 génbe	49.
V.2.1.2. Homológ rekombináns klónok keresése	50.
V.2.2. Az ORF1 gén inaktiválása és esszenciális voltának bizonyítása új módszer segítségével	52.
V.2.2.1. A módszer elve	52.
V.2.2.2. A kísérletek során használt plazmidok konstrukciója	55.
V.2.2.3. Az ORF1 gén inszerciós inaktiválása és a rekombináns klónok analízise	59.

V.2.2.4. A mutánsok fenotípusa	61.
V.2.2.5. Plazmid-helyettesítési kísérletek hőérzékeny plazmidokkal	63.
V.2.2.6. Plazmid-helyettesítési kísérletek hőstabil plazmidokkal	67.
V.3 A P31 protein túltermelésének fenotipikus hatásai	75.
VI. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE.	78.
VII. ÖSSZEFOGLALÁS	100.
VIII. FÜGGELÉK	101.
IX. IRODALOMJEGYZÉK	105.

BEVEZETÉS

Az összes élőlény közül az *Escherichia coli* baktériumot tanulmányozták a legalaposabban. $4,7 \times 10^6$ nukleotid hosszúságú, cirkuláris genomján ezernél több gént térképeztek, a kromoszóma restrikciós térképe is elkészült és a genom nagy részének nukleotidsorrendje ismert. Sokáig a géntermékhez tartozó gén azonosításához csak a hagyományos genetikai módszerek álltak rendelkezésre, ami meghatározta az azonosítás útját: valamilyen adott enzim-(vagy egyéb) aktivitás ismeretében lokalizálták a funkció megváltozásáért felelős mutációt a kromoszómán. A molekuláris biológiai vizsgálómódszerek fejlődésével azonban gyorsan nőtt az ismert szekvenciájú kromoszómaszakaszok mérete, amelyeken a hagyományos úton azonosított géneken kívül ismeretlen funkciójú géneket kódoló open reading frame-ek (nyitott leolvasási sor, ORF) találtak. Egyre gyakrabban merülhetett fel a probléma, érdemes-e ezen ORF-ek potenciális funkcióját keresni. A kérdésre nyilván nem lehet általános választ adni. Az értekezésemben egy, a munkám kezdetekor még ismeretlen funkciójú gén analízisét írom le, amely váratlan, de igen érdekes eredményre vezetett.

A dolgozat szerkezete a vizsgált kérdés természetének megfelelően kissé rendhagyó: az Irodalmi áttekintésben csak a gén felfedezéséről és kezdeti vizsgálatáról írok. Az eredmények értelmezéséhez szükségesnek látott irodalmi

1100

Már
amikor
írta

adatokat az Eredmények megvitatása és a Függelék fejezetben közlöm.

Mivel a vizsgált gén a dolgozatban tárgyalt kísérletek idején ismeretlen funkciójú és névtelen volt, azt az Eredmények leírása fejezetben ORF1-nek, fehérjetermékét a monomer-molekulasúlyra utalva P31-nek nevezem.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az *rrnB* melletti ORF1 felfedezése, klónozása, expressziójának vizsgálata

Csoportunk az 1970-es évek elején kapcsolódott be az *Escherichia coli* (*E. coli*) riboszomális RNS-operonok működésének megismerését célzó kutatásba. Az *in vitro* DNS-manipulációs módszerek kialakulásával ígéretes lehetőség nyílt a transzkripció molekuláris mechanizmusainak vizsgálatára, amire az rRNS operonok igen alkalmasnak látszottak a róluk folyó igen intenzív és sokoldalúan szabályozott transzkripció miatt.

Kiss Antal és munkatársai bizonyították (1977), hogy a riboszomális RNS operonok száma *E. coliban* hét. Boros Imre és munkatársai elkészítették a hét rRNS operon és kromoszomális környezetük fizikai térképét (Boros és mtsai, 1979). Az alapvetően hasonló felépítésű operonok közül az *rrnB*-t választották a további részletesebb vizsgálatok tárgyául (az operon szerkezetének vázlata az 1.a ábrán látható).

Az *rrnB* operont több kutatócsoportban klónozták a λ rif^d₁₈ transzdukáló fágból. Csoportunkban Kiss Antal és munkatársai építették plazmidba (p2/12) az *rrnB* operont, amely az operon érett rRNS-eknek megfelelő részein kívül kb 1300 nukleotidot tartalmaz a 16S rRNS 5' végétől proximálisan (Kiss A. és mtsai, 1978). (+1: az érett 16S rRNS-t meghatározó első nukleotid, a transzkripció

irányában fekvő nukleotidokat +, az ellentétes irányban levőket - előjel jelöli.)

A kromoszóma- és a λ rif^d18-DNS-en végzett transzkripciók kísérletek összehasonlítása ellentmondásokra vezetett, melyek úgy volt feloldhatók, ha komplex promoterrégiót feltételeztek (Boros és mtsai, 1983a). Ennek tisztázására az *rrn* operonokat közvetlenül a kromoszómából is klónozták plazmid vektorba *Bam*HI enzimet használva, amely egyik *rrn* operonon belül sem hasít (Boros és mtsai, 1983b). Az *rrnB*-t hordozó rekombináns plazmid, a pBK17 nem volt stabilan fenntartható a sejtben, feltételezhetően az *rrnB* működése miatt. Ezért a pBK17 egyes részeit Boros Imre szubklónozte, hogy az *rrnB* promoterrégióját tartalmazó stabil plazmidokat nyerjen (Boros és mtsai, 1983b, Boros, 1984).

A pBK17 plazmid egyes szubklónjainak vizsgálatakor RNS-polimeráz-DNS-komplex filterkötési technikával két, eltérő sajátságokkal rendelkező RNS-polimeráz kötő régiót találtak: az ismert P1 és P2 promotereket tartalmazó szakaszt, és egy távolabbit, a -1300-as régióban.

A filter-kötési, elektronmikroszkópos (Kiss I. és mtsai, 1980) és *in vitro* transzkripciók kísérletek eredményeképpen megállapították, hogy a távolabbi kötőhely erősebb, a komplex kisebb RNS-polimeráz/DNS aránynál is létrejön, és - a P1 P2-től eltérően - só- és heparinrezisztens. Két transzkripció-iniciációs pontot azonosítottak a távolabbi régióban. *In vivo* a transzkripció az

érett rRNS-eknek megfelelő részen folytatódik, és sem rhó-independens, sem dependens terminátor nem működik a közbeeső szakaszon (Boros és mtsai, 1983a).

Meghatározták a nukleotidszekvenciát -700-tól +80-ig (Csordás-Tóth és mtsai, 1979), és -1820-tól -690-ig (Boros és mtsai, 1983a). Az utóbbi szakaszon azonosították az új promotereknek megfelelő szekvenciákat. A konzervatív szekvenciájú -10-es RNS-polimeráz kötő régióhoz hasonló szekvencia (Pribnow-box): -1265 - -1271 között (P3) és -1337 - -1343 között (P4) található. A másik, a bakteriális promoterek többségére jellemző promoter-szekvenciarészlet, a -35-ös régió nem található sem a P3, sem a P4 -10-es szekvenciát megelőző részen. Mindkét Pribnow-box előtt egy-egy hat nukleotidos szekvenciariészlet megismétlődik: CTTATC a P4, és TCACCT a P3 előtt. A P4 promoter előtt egy tíz nukleotidos inverted repeat található. A promoter régió szekvenciája az itt tárgyalt jellemzők megjelölésével az 1.b ábrán látható.

E különös szerkezetű promoter régió és a P1 P2 promoter régió között -1234-től -376-ig nyitott leolvasási keret található, amely egy 289 aminosavból álló polipeptidláncot kódol. Az ORF szekvenciáját másik kutatócsoport is publikálta a λ rif^d18 fágból klónozott *rrnB* operon szekvenciájával együtt (Brosius és mtsai, 1981). A fág- és a baktérium-szekvencia kapcsolódási pontja közvetlenül az ORF előtt (5' irányban) van, tehát a λ rif^d18 a P3 és P4 promotereket nem tartalmazza.

Így a fág-eredetű, illetve bakteriális szekvenciákon megfigyelt RNS polimeráz kötési és transzkripciós különbségek a P3 és P4 promoterek hiányára, illetve jelenlétére vezethetők vissza. A P3 és P4 promotert az *rrnB*-hez tartozónak tekintették, mivel a róluik induló transzkripció nem terminálódik az *rrnB* előtt.

Boros Imre és munkatársai (1983b) a promoterek *in vivo* működésének vizsgálatára alkalmas plazmid-családot hoztak létre. E plazmidokban az érett rRNS-eknek megfelelő DNS nagy részét eltávolították és az *rrnB* T1 és T2 transzkripciós terminátor szignáljai 600-800 nukleotiddal a P1 és P2 promoterek mögé kerültek. A transzkripciós termék lerövidítésével a plazmidok az erős promoterek jelenléte ellenére *E. coliban* stabilan fenntarthatóvá váltak és a transzkriptumok a kromoszomális termékektől könnyen megkülönböztethetőek lettek, a stabil rRNS-ekre jellemző féléletidővel. Az egyes plazmidok a transzkripciós iniciációs helytől proximálisan különböző pozícióban kezdődő kromoszomális eredetű szakaszokat tartalmaztak. E kísérleti rendszerben lehetővé vált a két promoterpárosról induló transzkripció sajátosságainak összehasonlítása.

Az 1.c ábrán bemutatom az alap-plazmidot, a p418-23 jelűt, amelyből deléciókkal állították elő a különböző promoterpárokat tartalmazó származékokat. Mivel a p418-23 a teljes open reading frame-et hordozta, a szükséges transzkripciós-transzlációs szignálokkal együtt, és homológ rekombinációs kísérletekhez elegendő hosszúságú

kromoszomális régiót hordozott, az V.2. fejezetben leírt plazmidokat e plazmid felhasználásával készítettem. A p418-23 stabilan, a pBR322 vektorra jellemző kópiaszámban fenntartható *E. coliban*, annak növekedési rátáját nem befolyásolja (Boros és mtsai, 1983a).

A fent ismertetett plazmidokon végzett kísérletek szerint (Boros és mtsai, 1983a,b) a P3 és P4 promoterekről induló transzkripció cirkuláris templáton sokkal gyengébb, mint a P1, P2-ről induló. A két promoter-párról *in vitro* vagy *in vivo* szintetizálódó RNS molekulák mennyiségének arányában nincs jelentős különbség.

Nem találtak különbséget a P1 és P2 promoterekről szintetizálódó transzkriptumok mennyiségében a p418-23, p408-05 és a p511-21 plazmidokon sem. Mivel ezek a plazmidok a P3,P4 promoterek és a két promoter-pár közötti DNS meglétében vagy hiányában különböznek, e kísérletek nem támasztották alá azt a feltételezést, hogy a távolabbi promoterek vagy a két promoter régió közötti rész funkciója a P1 és P2 promoterek aktivitásának növelése (Boros, 1984).

Jelentős eltéréseket tapasztaltak, amikor a két promoter-párról induló *in vitro* transzkripciót szuperhelikális szerkezetű és lineáris templáton hasonlították össze (Boros, 1984). Szuperhelikális templáton 50 mM KCl jelenlétében, heparin nélkül a P3,P4-ről induló transzkripció alig kimutatható, a P1,P2-ről induló transzkripció ezt nagyságrendekkel meghaladja. Ugyanilyen körülmények kö-

zött lineáris templáton a promoter-párok aktivitás-aránya nagymértékben megváltozik: a P1,P2-ről szintetizálódó RNS-ek mennyisége erősen csökken, a P3,P4 aktivitása igen erősen megnő, felülmúlja a P1,P2-ét. Lineáris templáton a P1,P2 heparin-érzékenyek (cirkuláris templáton a P2 heparin-rezisztens), 25 $\mu\text{g/ml}$ heparin-koncentrációnál már nincs kimutatható transzkripció, a P3,P4 promoterek heparin-rezisztensek, a legnagyobb alkalmazott heparin-koncentrációnál (100 $\mu\text{g/ml}$) sem csökken aktivitásuk. A sókoncentráció emelésének hatására a P3,P4-ről induló transzkripció kisebb mértékben csökken, mint a P1,P2-ről induló (a magasabb sókoncentráció cirkuláris templáton kismértékben növeli a P3,P4 aktivitását).

Erdei Sára és munkatársai (1983) kimutatták, hogy az ORF által kódolt hipotetikus protein szintetizálódik p418-23 plazmiddal transzformált sejtekben. A kromozómát nem tartalmazó minisejt-preparátumban a szintetizálódó fehérjét radioaktív aminosavval jelölték. A minisejt-fehérjék kétdimenziós gélelektroforézise és autoradiográfia után egy 31 kDa méretű proteinnek megfelelő folt jelent meg, amely a kontroll pBR322 plazmidot tartalmazó minisejtekből hiányzott (a protein aminosavösszetételéből számított molekulásúly 31 386 Da). A protein a plazmid-kódolta β -laktamáz- és pre- β -laktamáznál kisebb mennyiségben volt jelen.

Ezen eredmények ismeretében a csoportban az a vélemény alakult ki, hogy a P3 és P4 promoter és az ORF1 az *rrnB*

operonhoz tartoznak, mivel a P3,P4-ről induló transzkripció nem terminálódik az *rrnB* előtti szakaszon, kimutathatóan a P2-től 3' irányban legalább 300 nukleotidig folytatódik. Az *rrnB*-t a P3 P4 promoterekkel együtt olyan transzkripciós egységnek tekintették, amelyről két különböző típusú RNS-t (mRNS; rRNS-ek és tRNS) tartalmazó elsődleges transzkriptum képződik. Feltételezték, hogy az ilyen "vegyes" operonok (mint a tRNS-géneket és a TufB elongációs faktor génjét tartalmazó operon: Hudson és mtsai, 1981) a mRNS-stabilitás meghatározásán át, a transzkripció-transzláció folyamatában fontos szerepet játszó molekulák szintézisének koordinált szabályozásában játszanak fontos szerepet. Bár a kezdeti kísérletek nem szolgáltatottak bizonyítékot, feltételezték, hogy az ORF1 által kódolt fehérje résztvesz az rRNS szintézis szabályozásában.

Andres Raukas későbbi vizsgálatai szerint a P3,P4 promoterekről induló transzkripció csökkenti a P1 promoteren megnyilvánuló stringens-kontrollt. A transzlációs terméknek nincs szerepe e hatásban, és a P3 és a P4 promóter nem áll stringens kontroll alatt (Balikó és mtsai, 1988).

Amikor az összes rRNS-operon és környezete szekvenciája ismertté vált, bebizonyosodott, hogy a P3,P4 promoterek és az ORF egyediek.

A 89,5 min kromoszóma-szakaszon elhelyezkedő gének

Munkám kezdetekor, 1983-ban számos, a transzkripcióban-transzlációban szerepet játszó gén volt ismert ebben a régióban (Bachman, 1983). Később a technikák fejlődésével egyre gyorsuló ütemben folyt új gének térképezése, klónozása, szekvenciájának meghatározása, a genetikai, a fizikai térkép és a szekvenciák egymáshoz rendelése. 1992-ben 30 kb hosszúságú összefüggő DNS-szakasz szekvenciája ismertté vált a 89,3-90 min kromoszómaszakaszon (Bachman, 1990, Gustafsson és Warne, 1992). A régió tartalmazott néhány ismeretlen funkciójú ORF-et és néhány ORF-mel nem azonosított gént. Folyamatosan figyelemmel kísértem a térkép-adatok gyarapodását, hiszen számítani lehetett rá, hogy előbb-utóbb a hagyományos úton járva azonosítják az ORF1-et.

1985-ben klónozták a *btuB* gént, meghatározták kromoszomális pozícióját és nukleotid-szekvenciáját (Heller és mtsai, 1985a, Heller és Kadner, 1985b). Az ORF1 gén szempontjából igen érdekes az elhelyezkedése: az ORF1-től 5' irányban, azzal azonos DNS szálon van, 3' vége az ORF1-gyel 65 nukleotid hosszúságban átfed, de a két gén reading frame-je különböző. *E. coli* kromoszómán ritka a hosszú génátfedés (az ismert gének között ez a leghosszabb), és nem sok példa van arra, hogy egy gén promoterei másik génen belül vannak. Nem ismert még, befolyásolja-e a *btuB*-ről folyó transzkripció-transzláció a P3 és a P4 működését, és hogy a *btuB* promoteréről induló transzkripció az ORF1 gén végéig folytatódik-e.

III. CÉLKITŰZÉSEK

Amikor a kutatócsoportba kerültem, nyitott kérdés volt, hogy az *rrnB* mellett elhelyezkedő ORF1 fehérjetermékének van-e valamilyen szerepe a riboszomális RNS-szintézis szabályozásában. A munkám célja eredetileg az volt, hogy az e kérdés vizsgálatát célzó kísérletekhez teremtsen meg a feltételeket. Egyik feladatomban az ORF1 által kódolt protein izolálása volt *E. coliból* és a fehérjével specifikusan reagáló ellenanyag előállítás, a másik pedig az ORF1 inaktiválása a kromoszómán. E feladatok végrehajtásával párhuzamosan megpróbáltuk kimutatni a fehérjének valamilyen hatását az *rrnB* transzkripció-regulációra, sikertelenül. Ezek a kísérletek nem tárgyai az értekezésnek. 1992-ig több alkalommal hasonlítottam össze a protein aminosavszekvenciáját különböző adatbankok proteinjeivel, de nem volt köztük egy sem, amely szignifikáns hasonlóságot mutatott volna. Különböző funkciókhoz társuló ismert aminosavszekvenciamotívumok keresése is eredménytelennek bizonyult. A szekvenciaösszehasonlításokkal nem foglalkozom a dolgozat Eredmények fejezetében, mivel nem vittek közelebb a fehérje funkciójának megfejtéséhez.

A kísérletek során egyre valószínűbbnek látszott, hogy az ORF1 nem játszik szerepet az *rrnB* szabályozásában. Mégsem hagytam abba vizsgálatát, mivel a gén-inaktiválási kísérletek igen érdekes eredményhez vezettek: a feltételesen letális ORF1 mutánsok és a P31 proteint

túltermelő sjték fenotípusa a nukleoid-szegregáció és a sejtosztódás zavarát jelezte, és a sejtekből izolált plazmidok topoizomerjeinek eloszlása a vad típusútól nagymértékben eltérő volt. Az Eredmények fejezetben leírt kísérletek befejezése időszakában egy másik kutatócsoport azonosította az ORF1-et egy sejtfalkomponens szintéziséért felelős enzim génjével. Ez a felismerés azonban a sejtfalszintézisre vonatkozó jelenlegi ismeretek alapján nem teszi könnyen magyarázhatóvá az általam megfigyelt jelenséget. A megvalósított célkitűzések tehát nem az eredeti kérdés, hanem az ORF1 funkciójára vonatkozó új kérdések megválaszolásához nyújthatnak - reményeim szerint - segítséget.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. VEGYSZEREK, PREPARÁTUMOK, BAKTÉRIUMOK, PLAZMIDOK

V.1.1. Vegyszerek, izotópok:

A vegyszerek alt. minőségű, kereskedelmi forgalomban beszerezhető készítmények voltak. Egyes vegyszerek forrását az alkalmazásuk leírásával együtt közlöm a IV.1.1.-IV.2.20. fejezetekben.

Radioaktív izotóppal jelölt vegyületek:

$[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$, $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$: Amersham, Specifikus aktivitás: 37-110 TBq/mmol (1000-3000 Ci/mmol)

$[\text{}^{35}\text{S}]\text{Metionin}$: Amersham, *in vivo* cell labelling grade, >37TBq/mmol (>1000 Ci/mmol)

IV.1.2. Enzimpreparátumok

A restrikciós endonukleázok többségét az SzBK Biokémiai Intézet dolgozói állították elő. A *Cla*I, *Dra*I, *Taq*I enzimek New England Biolabs készítmények voltak. A T4 polinukleotid ligázból és a DNS polimeráz I Klenow fragmentumból házi készítményeket és New England Biolabs termékeket használtam. A proteínáz K Merck, a pankreasz RNáz és a lizozim Serva preparátum volt.

IV.1.3. Táptalajok, antibiotikumok

Minimál-tápfolyadéként M9 médiumot használtam (Miller, 1972). Összetétele a következő: Na_2HPO_4 6 g/l,

KH_2PO_4 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH_4Cl 1 g/l. Sterilizés után 0,1 mM CaCl_2 -dal és 0,2 M MgCl_2 -dal egészítettem ki (ez utóbbi komponens nem szerepel az eredeti receptben). A szénforrás 0.2% glukóz volt. 0,2% casaminosav-preparátumot vagy egyes L-aminosavakat 40 $\mu\text{/ml}$ koncentrációban és 1 $\mu\text{g/ml}$ B1 vitamint adtam kiegészítésként a tápoldathoz.

"Gazdag" tápfolyadéként YTB-t használtam, összetétele: 1% Bacto-Tryptone (Difco), 0,5% Yeast-extract (Difco), 0,5% NaCl. A pH-t NaOH-dal 7,5-re állítottam.

A táptalajok 1,5% Bacto-agart (Difco) tartalmaztak.

Az antibiotikumokat a következő koncentrációkban használtam:

Ampicillin (Pharmacia) 100 $\mu\text{g/ml}$; 50 $\mu\text{g/ml}$

Kanamicin (Sigma) 50 $\mu\text{g/ml}$; 30 $\mu\text{g/ml}$

Kloramfenikol (Sigma) 25 $\mu\text{g/ml}$; 12,5 $\mu\text{g/ml}$

Tetraciklin (Sigma) 12,5 $\mu\text{g/ml}$

IV.1.4. Baktériumtörzsek és plazmidok

A baktériumtörzsek *Escherichia coli* K-12 származékok:

C600 (F^- *thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21 supE44 mcrA*)

(Appleyard, 1954)

HB101 (*proA2 lacY1 hsdS20(r⁻m⁻) recA13 rpsL20 ara-14*)

galK2 xyl-5 mtl-1 supE44) (Boyer és mtsa 1969)

JM107 (*endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 λ^-*)

$\Delta(\text{lac-proAB})$ [F' , *traD36 proAB lacI^qZ Δ M15*])

(Yanisch-Perron és mtsai, 1985)

Plazmidok:

- pBR322 Ap^R Tc^R, pMB1 replikon (ColE1-származék)
(Sutcliffe, 1978, Bolivar és mtsai, 1979)
- pHSG422 Ap^R Cm^R Km^R, pSC101 replikon t^S származék,
alacsony kópiaszám (Hashimoto-Gotoh és mtsai,
1981)
- pACYC184 Cm^R Tc^R, p15A replikon
(Chang és Cohen, 1978, Rose, 1988)
- pHC624 Ap^R, nagy kópiaszámú pBR-származék
(Boros és mtsai, 1984)
- p418-23 Ap^R, ORF1 (Boros és mtsai, 1983b)
- p418-23::Tn5-26 Km^R, Ap^R, az ORF1-et megszakító Tn5
transzpozont hordozó plazmid
(Balikó és mtsai, 1988)
- p408-05 Ap^R, *rrnB* P1, P2 promoterek (Boros és mtsai
1983b)
- pPE06 Tc^R Ap^S, pBR-származék (Boros és mtsai,
1983a)
- pER235 expressziós vektor (Lukacsovich és mtsai,
1990)
- pER23CT expressziós vektor (Lukacsovich és mtsai,
1990)
- pKK223-3 expressziós vektor (Brosius és mtsai)
- pVH1 Km^R, pBR-kompatibilis, *lacI^q*
(Haring és mtsai, 1985)

IV.2. A KÍSÉRLETI MÓDSZEREK LEÍRÁSA

IV.2.1. Plazmid-DNS izolálás *E. coliból*

A plazmidokat 1,5-100 ml stacioner fázisú kultúrából az alkalikus extrakciós módszerrel izoláltam (Birnboim és Doly, 1979) a Maniatis és munkatársai (1982) által leírt protokollt követve.

IV.2.2. Össz-DNS preparálás *E. coliból*

Az össz-DNS-t 10-100 ml, 12-16 óráig YTB tápfolyadékban tenyésztett stacioner kultúrákból izoláltam. A médium tartalmazta a plazmidon és a kromoszómán levő rezisztencia-géneknek megfelelő antibiotikumokat. A preparálás menete (az oldat-térfogatok 100 ml kiindulási térfogatra vonatkoznak):

1. A baktériumokat centrifugálással leüleptettem (4000 rpm, 30 perc).
2. A sejteket mostam 50 ml TE pufferben (50 mM Tris-Cl pH 7,5 1 mM EDTA) és újra üleptettem centrifugálással.
3. A sejteket 5 ml TE-pufferben szuszpendáltam, majd 2,6 ml TE-ben oldott 5%-os Na-lauroil-szarkozint adtam a szuszpenzió lassú kevergetése közben. A szuszpenzióhoz előzőleg 2 órán át 37 °C-on inkubált (DN-áz mentesített) pronáz vagy proteináz K törzsoldatból adtam 1 mg/ml végkoncentrációban, majd 37 °C-on inkubáltam, amíg áttetszővé és viszkózussá vált (általában egy éjszakán át).



4. Kétszer fenol-kloroformos, és egyszer kloroformos extrakciót végeztem, a fázisokat lassú forgatással 20 percig elegyítve, majd centrifugálással szétválasztva (800 rpm, 10 perc).

5. A DNS-t 0,3 M Na-acetát (pH 5,2) hozzáadása után 2 térfogat szobahőmérsékletű etanollal kicsaptam, majd üvegpálcikára tekertem, 70%-os etanolban mostam és vákuum-exszikátorban megszáritottam.

6. A DNS-t 4 ml TE-ben feloldottam, és 50 mg/ml pankreasz RN-áz jelenlétében inkubáltam kb 12 órán át.

7. Újra fenol-kloroformos extrakciót végeztem a 4. pontban leírtak szerint.

8. A DNS-t etanollal kicsaptam, mostam és szárítottam az 5. pontban leírt módon.

9. A kész, nagy molekulásúlyú kromoszóma-DNS-t és plazmidokat tartalmazó preparátumot 1-2 ml 10 mM Tris-Cl pH 7,6 1mM EDTA 10 mM NaCl oldatban oldottam fel és 4 °C-on tároltam.

IV.2.3. *E. coli* transzformáció

A kalcium-kloridos módszert alkalmaztam (Cohen, 1972) a Maniatis és mtsai (1982)-ben leírtak szerint. A sejteket a plazmid hozzáadása előtt általában egy órán át tartottam 0 °C-os 0,1 M CaCl₂ oldatban. Amikor nagyobb transzformációs hatékonyságot szerettem volna elérni, az inkubálást hosszabb ideig, de 24 óránál nem tovább végeztem (Dagert és Ehrlich, 1979).

IV.2.4. DNS-fragmentumok méret szerinti elválasztása gélelektroforézissel

Agaróz gélelektroforézis:

Az elválasztandó fragmentumok mérete szerint választottam az agaróz-koncentrációt 0,8-1,6% (w/v) között. Az agaróz Sigma készítmény volt (type V high gelling temperature). A gél a futtató pufferrel megegyező tris-acetát pufferben készítettem el (50 mM Tris- bázis, 20 mM Na-acetát, 2 mM EDTA, pH 8,05). A mintákat glicerol, EDTA és brómfenolkék tartalmú oldat hozzáadása után 6-10 V/cm feszültséget alkalmazva elektroforetizáltam. A gél általában 500 ng/ml ethidium bromidot tartalmazott, egyes esetekben azonban (pl. emésztetlen plazmidok vizsgálatakor) a gél utólag festettem 500 ng/ml ethidium bromid oldatban 30 percig. Az EthBr-dal festett DNS-t 250-300 nm hullámhosszú UV fényben megvilágítva tettem láthatóvá, sárga színszűrőt alkalmazva fotóztam ORWO NP22 síkfilmre.

Poliakrilamid gélelektroforézis:

Az 500 bp-nál kisebb méretű DNS-fragmentumokat 4, 5, vagy 6%-os poliakrilamid gélben (akrilamid:biszakrilamid-arány 20:1) választottam szét. A gél- és tankpuffer TBE volt (90 mM Tris-borát pH 8,3 2,5 mM EDTA). Az elektroforézist 5-10 V/cm feszültséggel végeztem, a DNS-t EtBr festés után UV fényben megvilágítva fotóztam.

IV.2.5. Plazmidok topológiai állapotának vizsgálata agaróz gélelektroforézissel

A plazmid topoizomereket klorokvin jelenlétében végzett agaróz gélelektroforézissel választottam szét (Pruss, 1985). A cirkuláris plazmid preparátumokat 1%-os agaróz gélben futtattam, Tris-foszfát pufferben (50 mM Tris-bázis, 2,8 mM Na₂EDTA és kb. 25 mM H₃PO₄, pH 7,2), klorokvin-szulfát (Sigma) jelenlétében, amit különböző koncentrációkban alkalmaztam (13-60 µg/ml). Az elektroforézist 5 V/cm-mel végeztem 16 órán át szobahőmérsékleten. A DNS ethidium-bromidos festése előtt a klorokvint eltávolítottam a gélből 3-4 órás áztatással desztillált vízben és 1mM MgSO₄-ben, többszöri oldat-cserével. A gél 1-2 órán át 1 mg/ml ethidium-bromidban áztattam, 1 órán át desztillált vízben vagy 1 mM MgSO₄-ben differenciáltam, majd az előző pontban leírt módon fényképeztem.

IV.2.6. DNS fragmentum-izolálás agaróz gélből

Az izolálást a DEAE papíros módszert alkalmazva (Winberg és Hammarskjöld, 1980), a Maniatis és mtsai (1982) által leírtakhoz hasonlóan végeztem.

Az izolálni kívánt DNS fragmentumot tartalmazó géldarabot kivágtam az eredeti gélből és egy új gélbe öntöttem, amelybe a fragmentum elé (az elektroforézis irányában) helyeztem el a DEAE papírt. Az elektroforézis után a DNS-t megkötött DEAE papírt kétszer 125 µl 10 mM Tris-Cl pH 7,6 1 mM EDTA 10 mM NaCl oldattal mostam, majd

kétszer 125 μ l 1M NaCl oldattal eluáltam a DNS-t. Vízzel kétszeresére hígítottam, fenol-kloroformos extrakció után etanollal kicsaptam, mostam, és vákuum-szárítás után UP-vízben oldottam fel. Ezt a módszert alkalmaztam poliakrilamid gélben elválasztott fragmentumokra is.

IV.2.7. DNS emésztés restriktációs endonukleázokkal, DNS restriktációs fragmentumok ligálása, DNS végfeltöltés Klenow-polimerázzal

Az enzimreakciókat a New England Biolabs katalógusok által megadott körülmények között végeztem. A ligáláskor T4 fág polinukleotid-ligázt használtam.

IV.2.8. DNS *in vitro* radioaktív jelölése

Southern hibridizáció céljára a DNS-próbát a Feinberg és Vogelstein (1983) által leírt "random priming" módszerrel jelöltem α [32 P]dATP-vel vagy α [32 P]dCTP-vel. Körülbelül 100 ng DNS templátot használtam, a jelölést 4 órán át szobahőn végeztem. A jelölt fragmentumok specifikus aktivitása $>10^8$ cpm/ μ g DNS volt.

IV.2.9. Southern transzfer és hibridizáció

A Southern (1975) által közölt elven alapuló analízist a Maniatis és mtsai (1982) által leírt receptet követve végeztem. A hibridizáció 67 $^{\circ}$ C-on történt 10-12 óráig. A Maniatis és mtsai által leírt sztringens körülmények között mostam a filtereket. Az autoradiográfiához Medifort

filmet használtam. Általában erősítő screent (Dupont HI PLUS) alkalmazva, -70°C -on exponáltam a filmeket.

IV.2.11. Fehérjék molekulasúly szerinti szétválasztása poliakrilamid gélelektroforézissel

A fehérjék gélelektroforézisét SDS-tartalmú, diszkontinuous puffer-rendszerben végeztem (Laemmli, 1970), lényegében a Sambrook és munkatársai (1989) által leírt recept szerint. A gélkészítéskor az akrilamid:bisakrilamid-arány 29,2:0,8 volt. A tank-puffer összetétele: 0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1% SDS.

A gélt 50% metanol, 10% ecetsav, 0,1% Coomassie brilliant blue R 250 oldatban fixáltam és festettem, 5-20% metanol, 10% ecetsav oldatban differenciáltam.

Radioaktív izotóppal jelölt proteinek (IV.2.18.) elektroforézise után a gélt fluorografáltam (Amplify, Amersham), majd megszárítottam és -70°C -on, erősítő ernyő alkalmazásával, Medifort röntgen-filmre autoradiogramot készítettem.

V.2.12. Fehérjék kétdimenziós gélelektroforézise

A gélelektroforézist (első dimenzió: izoelektromos fókuszálás, második dimenzió: méret szerinti szétválasztás) O' Farrell (1975) módszerével végeztem.

V.2.13. A P31 fehérje izolálása *E. coli*ből oszlopkromatográfiás módszerekkel

Sejttenyésztés: a túltermelő HB101 (pERCHORF pVH1) törzs stacioner fázisú starter-kultúrájából 1:100 hígításban oltottam összesen 4-6 liter, 30 $\mu\text{g/ml}$ kanamicint és 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillint tartalmazó YTB-be. A 3 l térfogatú lombikokban lévő 1 l térfogatú kultúrákat 37 °C-on (melegsobában) 230 rpm fordulatszámmal rázatva tenyésztettem. Körülbelül 2,5 óra múlva, 0,5 OD₅₅₀ elérésekor 0,2-0,5 mM IPTG hozzáadásával indukáltam a P31-termelést. További 4-6 óra tenyésztés után a sejteket centrifugálással leüleptítettem (Sorvall RC-3B centrifuga, 4500 rpm, 30 perc, 4 °C).

Sejtfeltárás: a sejteket 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF összetételű oldatban szuszpendáltam (F-puffer; sejttömeg-grammonként 2 ml-t adtam a sejtekhez). A sejtszuszpenziót 30 ml adagokban ultrahangoztam, 15x 30 másodperces, 6 μm amplitúdójú impulzusokkal, MSE ultrahang-készülékkel. Az oldatot jeges vízben hűtöttem.

Ultracentrifugálás: a sejtek ultrahangos feltárása után a sejtburkok-törmelékeket és az esetleg épen maradt sejteket 30 000 rpm fordulatszámmal centrifugáltam 90 percig Beckman L2-65B vagy Sorvall OTD-50B ultracentrifugában 60 TI rotorral, 4-10 °C hőmérsékleten.

DNS-eltávolítás: Az ultracentrifugálás utáni felül-úszóhoz F pufferben oldott 10 %-os streptomycin-szulfátot

adtam 2 % végkoncentrációban, közben és a hozzáadás után 30 percig 0 °C-on kevertettem. A precipitált nukleinsavakat tartalmazó szuszpenzió centrifugálása után (40 000 g, 20 perc, 4 °C) a felülúszót PC pufferrel szemben dializáltam.

A dialízishez és a kromatográfiához használt oldatok:

PC puffer: 20 mM KH_2PO_4 - K_2HPO_4 pH 7,4, 10 mM glicerol, 10 mM 2-merkaptoetanol, 0,1 mM EDTA.

B puffer: 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 % glicerol, 10 mM 2-merkaptoetanol, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA.

Elúciós oldatok: az adott oszlop ekvibráló pufferében oldott KCl vagy NaCl (lásd az oszlopok felsorolásánál).

Töményítő-tároló oldat: 50% glicerol, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA.

Dialízis: a kromatográfiás tisztítási lépések között a P31 tartalmú fehérjeoldatokat a következő oszlop ekvibráló puffer vagy (az utolsó oszlop után) a tároló puffer 50-100-szoros térfogatával szemben, kétszeri-háromszori puffer-cserével, 24-48 órán át 4 °C-on dializáltam, a puffert mágneses keverővel kevertetve.

A kromatográfiához használt oszlopok és a kromatográfia körülményei:

DEAE-cellulóz (Bio-Rad): 90-100 ml oszloptérfogat, PC pufferrel ekvibrálva, elúció 500 ml 0-0,8 M KCl-gradienssel, PC pufferben.

Kettős szálú DNS-agaróz és egyes szálú DNS-agaróz (Udvardy Andor készítménye, csirkevér-DNS-t tartalmaz): B pufferrel ekvilibrálva, elúció 0,1-2 M NaCl-gradienssel, B-pufferben.

ω -aminopentil-agaróz (Sigma): PC pufferrel ekvilibrálva, elúció 0-1 M KCl gradienssel, PC pufferben.

Heparin-agaróz (Sigma): PC pufferrel ekvilibrálva, elúció 0-0,8 M KCl-gradienssel, PC pufferben.

Hidroxilapatit (Bio-Rad): PC-pufferrel vagy glicerin nélküli PC pufferrel ekvilibrálva, elúció 0-1 M, az ekvilibráló pufferben oldott KCl- gradienssel.

Minden oszlopkromatográfiát 4 °C-on végeztem.

A kromatográfiás oszlopokon az oldatokat állandó sebességgel perisztaltikus folyadéktovábbító pumpa segítségével áramoltattam át. Frakciókollektorral az oszlopmérettől függően 3-5 ml frakciókat gyűjtöttem. Az oszlopról távozó oldat fehérjetartalmát átfolyó fotométer-cellát tartalmazó UV-monitorral (Pharmacia LKB) detektáltam, a monitorhoz az abszorpciót az idő függvényében ábrázoló írószerkezet csatlakoztatásával.

Az oszlopokat a fehérjeoldat felvitele után a kifolyó oldat abszorpciójának 0-hoz közeli értékre csökkenéséig (1,5-2 oszloptérfogat) ekvilibráló pufferrel mostam. Az oszlopon kötődött fehérjék elúciója 5-10-szeres oszloptérfogatnyi, az ekvilibráló pufferben oldott, közelítőleg lineárisan növekvő koncentrációjú KCl-dal (vagy NaCl-dal) történt. A koncentrációgradienst gradienskeverő

tartály állította elő az ekvibráló puffer és a maximális sókoncentrációjú oldat lassú elegyítésével.

A kromatográfiás frakciók sókoncentrációját vezetőképesség-mérés után, az ekvibráló pufferben oldott, ismert sókoncentrációkat tartalmazó oldat-sorozatról készült kalibrációs görbe segítségével határoztam meg.

V.2.14. Fehérje natív molekulásúly meghatározása méretkizárásos kromatográfiával

A gélszűrést 26 cm magas, 1 cm átmérőjű Sephacryl S-200 oszlopon végeztem, 10 mM Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 pH 7,4 1 mM EDTA 150 mM NaCl 10 mM 2-merkaptoetanol összetételű oldatban, kb 20 ml/h folyási sebességgel. A protein preparátumokat 400 μl térfogatban vittem fel, <10 mg/ml koncentrációban. A kalibrációhoz a Pharmacia HMW gélszűrés-kalibrációs készlet proteinjeit használtam. Egy-egy gélszűréskor általában két-két, különböző párosításokban szereplő proteint tartalmazott a felvitt minta. A monitorozást írszerkezettel összekapcsolt Pharmacia UV detektor segítségével végeztem.

A kalibrációs egyenes az ismert natív molekulásúlyú proteinek K_{av} értékeinek a molekulásúly logaritmusára függvényében történő ábrázolásával készült. A K_{av} értékeket a $K_{av} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$ egyenlet alapján számoltam. V_e a protein elúciós térfogata, V_0 az oszlop kizárási térfogata ($=V_e$ Blue Dextrán 2000), V_t a teljes oszloptérfogat.

IV.2.15. Fehérjekoncentráció-meghatározás

A fehérjekoncentráció-meghatározást Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad) segítségével végeztem, BSA-kalibrációs görbét alkalmazva, 3 paralell mérés alapján.

IV.2.16. Kecske immunizálása *E. coli*ből izolált fehérjével

Poliklonális anti-P31 antiszérum előállítása céljából *E. coli* "P31-túltermelő" törzsből izolált P31 proteinnel végeztem az immunizálást.

600 μ l 10 mM nátrium-foszfát pH 7,4, 0,85% NaCl oldathoz, amely 1 mg P31 fehérjét tartalmazott, 600 μ l komplett Freund-adjuvánst adtam, és 2-3 perc vortexezés-sel emulziót képeztem. Az emulziót a lapocka környékére, több ponton a bőr alá fecskendeztük a kecskébe. Két héttel később 0,25 mg P31 fehérjét tartalmazó emulzióval az előzővel azonos módon juttattuk az antigént a kecskébe. Újabb két hét múlva 0,5 mg P31 proteint 0,5 ml 10 mM Na-foszfát pH 7,4, 0,85% NaCl oldatban vénába injektáltuk. Mindegyik alkalommal 5-10 ml vért vettünk, a szérumot -70°C -on tároltam. Az első antigén-injekció időpontjában nyert szérumot használtam preimmun-szérumként. A harmadik antigén-injekció után 10 nappal körülbelül 200 ml vért vettünk a kecske nyaki vénájából. Alvadás után a vérből centrifugálással 114 ml szérumot különítettem el. 70%-ig telített (0°C -on) ammónium-szulfáttal kicsaptam a szérum-fehérjéket. A csapadékot

háromszor mostam 1,75 M ammónium-szulfáttal, majd 50 ml 0,85% NaCl oldatban feloldottam, és ugyanezen sóoldattal szemben dializáltam. Az így tisztított szérumfehérje-oldatot kis térfogatokra szétosztva, -70 °C-on tároltam.

V.2.17. Immunprecipitáció

Az immunkomplex kialakítását és az immunkomplex precipitációját agarózhoz kötött *Staphylococcus Protein A*-val az aspecifikus kötést csökkentő, detergenset tartalmazó RIPA-pufferben végeztem, amelynek összetétele a következő:

RIPA-puffer: 10% Triton-X 100, 1% Na-deoxycholát, 0,1% SDS, 0,15 M NaCl, 0,05 M Tris-HCl pH 7,2

Az immunprecipitációt kis módosítással a Sambrook és munkatársai (1989) által leírt módon végeztem.

Radioaktív izotópot tartalmazó aminosavval *in vivo* fehérjejelölés után a sejtek lizátumából azonos cpm-értékeknek megfelelő mennyiségeket használtam egy-egy kísérletben. A *Staphylococcus protein A*-Sepharose-vel végzett aspecifikus kimerítés után a jelölt sejtfehérjéket tartalmazó RIPA-pufferhez 6 μ l preimmunszérumot vagy 3 μ l antiszérumot adtam. Az antiszérum optimális mennyiségét előzőleg meghatároztam. A preimmunszérum kétszeres térfogata tartalmaz az antiszérummal közelítőleg azonos mennyiségű immunglobulint (gélelektroforetikus kép alapján becsülve; továbbá lásd IV.2.16.).

SDS-poliakrilamid gélelektroforézis és fluorográfia után (IV.2.11.) autoradiogramot készítettem.

IV.2.18. Fehérjék in vivo radioaktív jelölése

A baktériumokat aminosavakkal kiegészített M9 tápfolyadékban tenyésztettem, amely 19 L-aminosavat tartalmazott 0,2 mM koncentrációban, a metionin kivételével. Az exponenciális fázis kezdetén a tápfolyadékhoz 10 μCi ^{35}S -L-metionint adtam. 4 óra jelölés után a sejteket centrifugálással leüleptítettem, majd Laemli-mintapufferben szuszpendáltam.

IV.2.19. Fehérjékbe épült radioaktivitás meghatározása

A sejt-lizátumból vett néhány μl mintát 20 μl 0,1% SDS, 10 mg/ml BSA oldattal együtt 1 ml 10%-os TCA-hoz adtam, egy perc forralás majd hűtés után Whatman GF/A filterre szűrtem. A filtert 15 ml 5%-os TCA-val és 5 ml etanollal mostam. A filtereken lévő radioaktivitást szárítás után 5 ml toluolos koktéliban folyadék-szcintillációt detektáló készülékben (Beckman) mértem.

IV.2.20. *E. coli* sejt- és nukleoid-alak vizsgálata fénymikroszkóppal

A sejt-alak fáziskontraszt-mikroszkópos vizsgálatához a baktériumokat a folyadékkultúrából vett mintákban 1%-os glutáraldehiddel fixáltam legalább egy óráig, ezután a sejteket centrifugáltam, 0,9%-os NaCl oldatban mostam,

centrifugálás után új 0,9 %-os NaCl oldatban szuszpendáltam.

A DNS és sejt morfológia egyidejű észleléséhez a mintákat a Hiraga és mtsai (1989) által leírt módon készítettem elő. YTA táptalajon nőtt kolóniákból vett mintákat mikroszkóp tárgylemezen szétkenve, metanol rácsepegtetésével fixáltam. Folyadékkultúrából vett, 0,9%-os NaCl-ben mosott majd újra szuszpendált 5-10 μ l-nyi mintákat a fixálás előtt a tárgylemezre szárítottam. A tárgylemezeket csapvízzel mostam, szobahőn megszártítottam, majd 5-10 μ l 5 μ g/ml poli-L-lizint (Sigma) csepegtettem a mintákra, és újra megszártítottam. 5 μ l 5 μ g/ml koncentrációjú, 0,9 %-os NaCl-ben oldott 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) hozzáadása után a tárgylemezre fedőlemezt helyeztem és a kiszáradás megelőzésére körömlakkal kentem be a szegélyeit.

A sejt-alakot és a DAPI-val festett fluoreszkáló nukleoidokat UV és látható fénnel egyidejűleg megvilágítva vizsgáltam a Hiraga és mtsai (1989) által kifejlesztett módszerrel. Olympus Vanox mikroszkópot használtam, 100* Neofluar objektívvel. A fényképeket Fujicolor HG 400 filmre készítettem. A dolgozatban bemutatott valamennyi fotó azonos nagyítású.

V. A KÍSÉRLETEK LEÍRÁSA

V.1. A P31 PROTEIN TÚLTERMELTETÉSE, IZOLÁLÁSA

E. COLIBÓL ÉS ANTI-P31 ELLENANYAG ELŐÁLLÍTÁSA

V.1.1. Az ORF1 beépítése expressziós vektorokba

Az ORF1 gén a gyengén expresszáldó *E. coli* gének közé tartozik. Erre utalnak Erdei Sára az Irodalmi áttekintésben tárgyalt, p418-23 plazmidot tartalmazó minisejteken végzett vizsgálatai is. Amikor p418-23 plazmiddal transzformált sejtek összfehérjekivonatát vizsgáltam kétdimenziós elektroforézissel, a P31-nek megfelelő folt a gyengébbek közé tartozott a kromozómáról szintetizálódó proteinekkel összehasonlítva. Az ORF1-et nem, csak a β -laktamáz gént expresszáldó plazmidot tartalmazó kontroll mintában a kromozómáról szintetizálódó P31 proteint nem sikerült kimutatni az *in vivo* radioaktívan jelölt fehérjék kétdimenziós elektroforézis utáni autoradiogramján.

Az alacsony szintű expresszió valószínű okai a gén gyenge promoterei, a gyenge riboszóma-kötőhely és az alacsony szinten expresszáldó génekre jellemző kodon-használat, azaz a minor aminosav-izoakceptor transzfer RNS-eknek megfelelő kodonok relatív gyakorisága. A plazmidról történő túltermeltetés elérése céljából elsősorban a promoterek és a riboszóma-kötőhely hatékonyabbra cserélése tűnt járható útnak. Mivel a fehérje funkcióját még

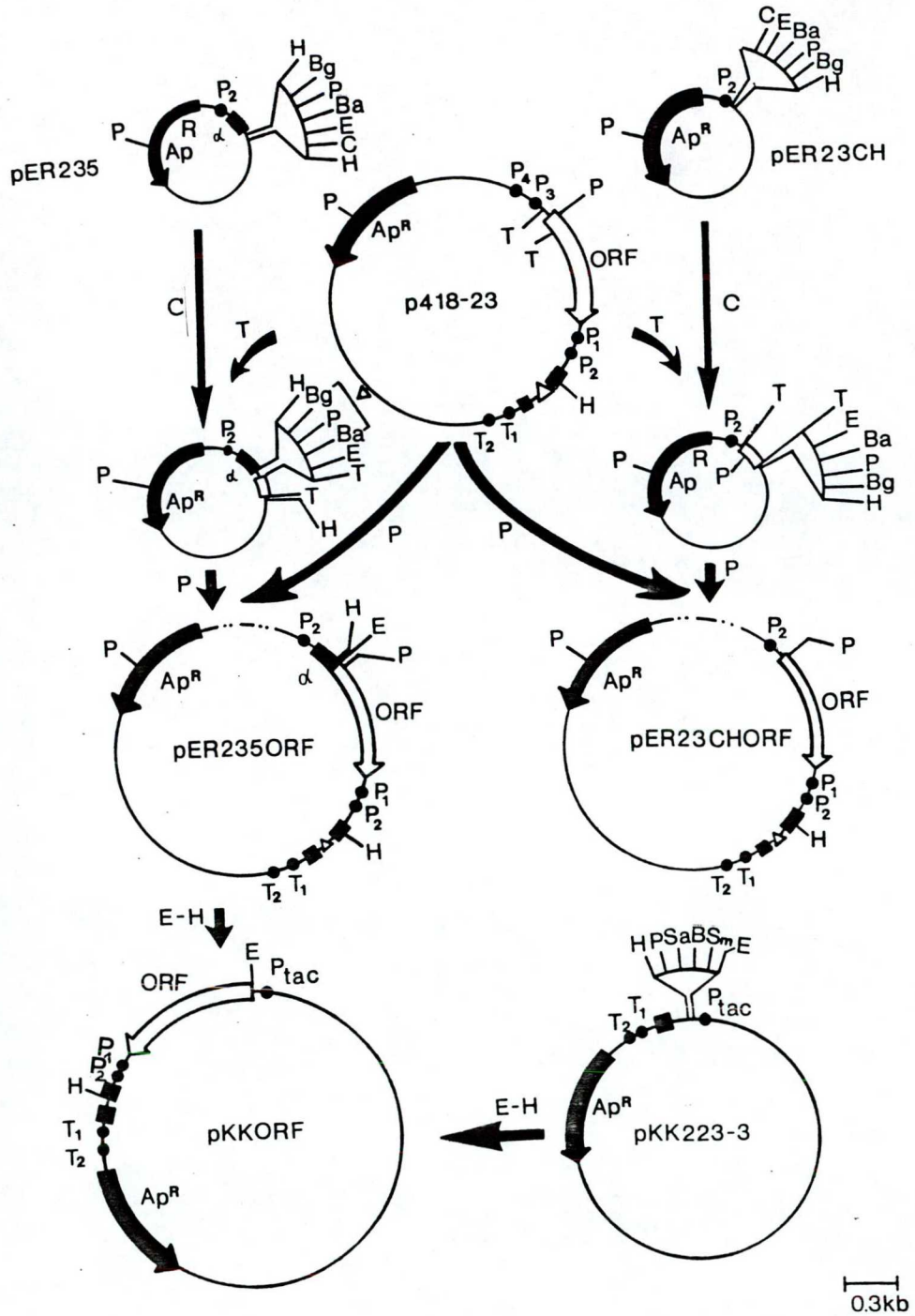
nem ismertük, nem tudtuk, vajon a protein jelentősen megnövekedett mennyiségét elviseli-e a sejt. A túltermelés ártalmas hatására utaltak Andres Raukas sikertelen kísérletei az ORF1 nagykópiaszámú vektorba építésére oly módon, hogy az *rrnB* P2 promoteréről expresszáldott volna (Andres Raukas, nem publikált kísérletek). Egy másik laboratóriumban is sikertelenül próbálkoztak az ORF1 géntermék túltermeltetésével (Scheibe, 1987).

Mindezek figyelembevételével olyan vektort kerestem, amely intenzív transzkripciót lehetővé tevő, de könnyen regulálható promotert hordoz, amelynek alapállapotában a transzkripció kismértékű. Csoportunkban Boros Imre létrehozta az erős rRNS promotereket tartalmazó pER plazmidcsaládot (Boros, 1984, Boros és mtsai 1986), amit Lukacsovich Tamás továbbfejlesztett (Lukacsovich és mtsai, 1990). Résztvettem az ezen vektorokba klónozott gének expressziójának fehérjeszintű vizsgálatában, és tapasztalataim alapján e vektorcsalád egyes tagjait választottam a P31 túltermeltetésére. Emellett a hibrid *tac* promotert hordozó pKK223-3 vektorba is beépítettem az ORF1-et. Minden klónozási lépés során a ligátumokkal a *lacI^q*-t tartalmazó JM107 törzset transzformáltam.

V.1.1.1. A pER235ORF plazmid konstrukciója

A pER235 plazmid sematikus rajza a 2. ábrán látható. Tartalmazza az *rrnB* P2 promoterét, ehhez egy *lac* operonból származó fragmentum csatlakozik, amelyen a *lac* operá-

tor, a *lacZ* riboszóma-kötő helye és a *lacZ* gén első 70 kodonja található egy *HindIII-HindIII* végű polilinker szekvencia előtt. E plazmidba oly módon építettem be az ORF1 gént, hogy a *lacZ* fragmentum és az ORF1 elhelyezkedése transzlációs kapcsoltságot tegyen lehetővé, de ne fúziós fehérje szintetizálódjék. Az ORF1 gén átklónozását megnehezíti, hogy 5' irányban nincs alkalmas, nagy specificitású restrikciós enzim hasítóhelye. Ezért az átklónozást két lépésben hajtottam végre. (A konstrukció a 2. ábrán követhető). A p418-23 plazmid *TaqI* emésztése után izoláltam azt a 181 nukleotid hosszúságú fragmentumot, amely az ORF1 riboszóma-kötő helyét és a gén 5' szakaszát tartalmazza. Ezt ligáltam a polilinker régióban *ClaI* enzimmel hasított pER235 DNS-hez (a *TaqI* és a *ClaI* hasítás után azonos ragadós végek keletkeznek). Az inszertet a megfelelő orientációban tartalmazó plazmidról (pER235-T) ezután eltávolítottam a polilinkerben levő *PstI* hasítóhelyet a *BamHI* és *BglIII* felismerőhelyek közötti szakasz deléciójával. A plazmidot a polilinkerben hasító *BamHI* és *BglIII* enzimekkel emésztettem, és az azonos ragadós végeket ligáltam. E művelet során a *lacZ* és az ORF1 leolvasási keretek egymáshoz viszonyított helyzete nem változott. Az utolsó lépésben a p418-23 plazmidból izolált 3,6 kb *PstI* fragmentumot ligáltam a pER235-T plazmidból izolált, a promoter-régiót, a *lacZ* szekvenciát és az ORF1 elejét tartalmazó *PstI* fragmentumhoz. A keletkezett hibrid plazmid (pER235ORF) a teljes ORF1-et



2. ábra. Az ORF1-et expresszáló plazmidok konstrukciója. P₁, P₂, P₃, P₄, P_{tac}: promoterek. T₁, T₂: terminátorok. α: a β-galaktoszidáz "α-peptid"-fragmentumát kódoló szekvencia. Restriktációs enzimek hasítóhelyei: Ba BamHI, Bg BglIII, C ClaI, H HindIII, P PstI, Sa Sall, Sm SmaI, T TaqI.

plazmidot, amelyen az ép ORF1 a *lac* operátor mögé került. A plazmidon jelen van a *lacZ* gén riboszóma-kötő helye az ORF1 start-kodontól nem optimális távolságban (3. ábra).

V.1.1.3.A pKKORF plazmid konstrukciója

A pKK223-3 expressziós vektor a *trp-lac*-hibrid *tac* promotert (de Boer és mtsai, 1983) tartalmazza a *lac* operátor szekvenciával, amelyet 3' irányban *EcoRI-HindIII* polilinker határol. A teljes ORF1-et tartalmazó *EcoRI-HindIII* fragmentumot izoláltam a pER235ORF plazmidból, és az *EcoRI* és *HindIII* enzimekkel hasított pKK223-3 plazmidba ligáltam (2. ábra). Az ORF1-et hordozó *EcoRI-HindIII*-fragmentumon az ORF1-től 5' irányban, azzal azonos leolvadási keretben egy (polilinker-eredetű) ATG kodon található, így az ORF tíz kodonnal meghosszabbodik. Ezen ATG kodontól 12 nukleotiddal 5' irányban van a pKKORF plazmidon a *lac* riboszóma-kötőhely. A 3. ábrán látható a pKKORF *lac* riboszóma-kötőhely és az eredeti ORF1 startkodonja közötti DNS-szakasz szekvenciája.

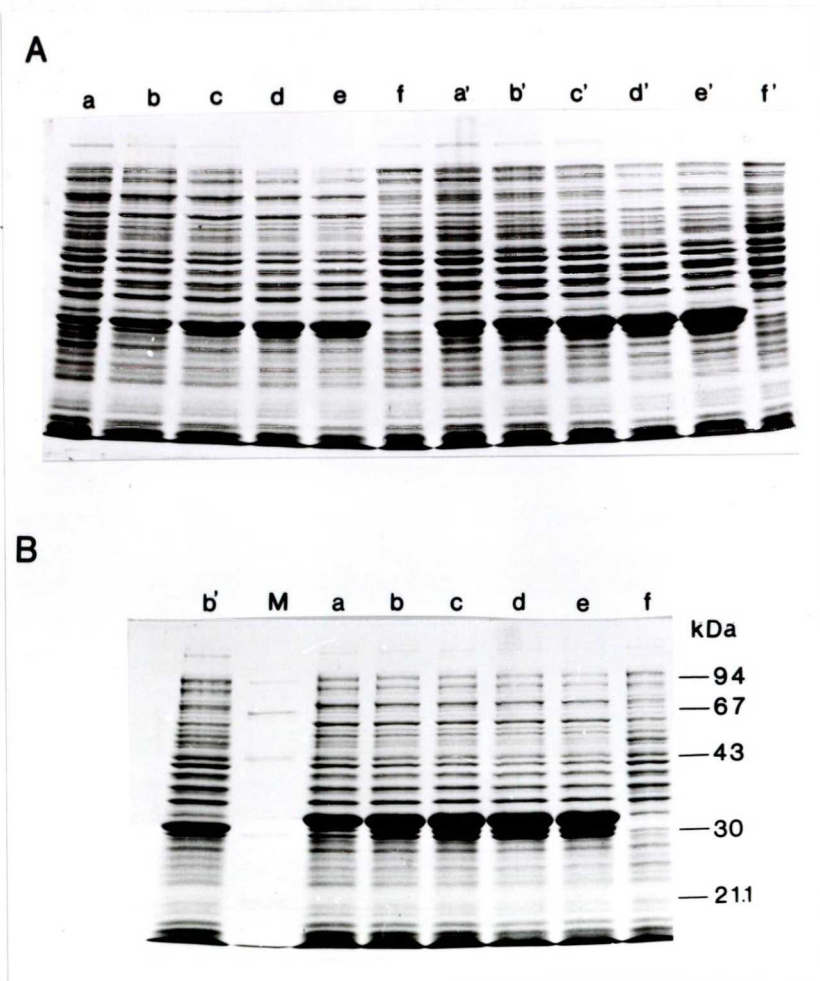
V.1.1.4. Az ORF1 gén intenzív transzkripcióját biztosító rekombináns plazmidok összehasonlítása

A túltermelő plazmidokat csak olyan sejtben lehet stabilan fenntartani és intenzív expressziót biztosítani indukció után, amelyben a *lac*-represszor mennyisége elegendő a több tucat kópiában jelenlévő plazmidon a transzkripció repressziójához. E célra többé-kevésbé

megfelelt a szuper-expresszázó *lacI^q* mutáns gént F plazmidon hordozó JM107. A pKKORF plazmid azonban nem teljesen represszáható ebben a törzsben. Mindhárom plazmid esetében nagyobb mértékű túltermelést és hatékonyabb repressziót tudtam elérni a túltermelő plazmid mellett a *lacI^q* gént hordozó pVH1 plazmiddal is transzformált HB101 törzsben. Ennek valószínűleg az az oka, hogy a pVH1, bár alacsony kópiaszámú, az egy kópiában jelenlévő F-plazmidnál nagyobb mennyiségű Lac-represszor-szintézist tesz lehetővé. A megbízható túltermeléshez talán hozzájárul a HB101 *recA* és *rpsL* genotípusa is.

A transzkripció-indukciót IPTG-vel végeztem. A sejteket gazdag tápfolyadékban, 37 °C-on erősen rázatva tenyésztettem. Az indukció lelassítja a szaporodást: minél korábbi növekedési fázisban adom az IPTG-t, annál nagyobb mértékben. A legnagyobb mértékű P31 túltermelés az exponenciális fázis közepén történő indukcióval érhető el.

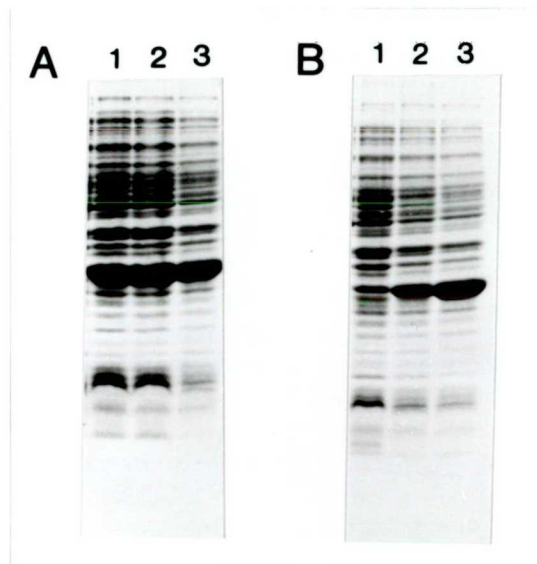
A túltermelés mindhárom plazmid esetén igen nagy mértékű: a P31 a legnagyobb mennyiségben jelenlévő sejtfehérje indukció után, és az egyre későbbi időpontokban vett mintákban az összfehérjéhez viszonyított mennyiségaránya egyre nő, legalább 10 órán át. A 4. ábrán látható a túltermelő sejtek fehérjemintázata SDS-poliakrilamid gélelektroforézis után. Az ábra egy tipikus tenyésztés eredményét mutatja. Látható, hogy a pER23CHORF plazmidról nagyobb mennyiségű P31 szintetizálódik, mint a pER235ORF-ről. A pKKORF expressziója a pERCHORF-hoz hasonló P31-



4. ábra. A különböző ORF1-expresszáló plazmidokról szintetizálódó P31 mennyiségének összehasonlítása SDS-PAGE-vel (12%-os gél). (A a-f) HB101 pVH1 pER235ORF; (A a'-f'), (B b') HB101 pVH1 pERCHORF; (B a-f) HB101 pVH1 pKKORF. (a-e) és (a'-e'): indukció után 2 (a, a'), 4 (b, b'), 6 (c, c'), 8,5 (d, d') és 10 (e, e') óra múlva vett minták. Az indukció $OD_{550}=0,35-0,40$ elérésekor 3 mM IPTG hozzáadásával történt. (f, f'): az e, e' mintákkal azonos sejtsűrűségű indukálatlan tenyészetből vett minták. M: molekulásúly-markerek (94, 67, 43, 30, 21,1 kDa).

szintet eredményez, de a pKKORF plazmidról szintetizálódó fehérje gélelektroforetikus mobilitása kisebb, mint az utóbbié (4.B ábra). A pER235ORF és a pERCHORF plazmidokról termelődő fehérje mobilitása a P31 számított molekulásúlyának megfelel. Az V.1.1.3. fejezetben leírtak alapján valószínű, hogy a pKKORF plazmidot tartalmazó indu-

kált sejtekben az ORF1-et megelőző, polilinker-szekvenciából származó ATG-ről induló transzláció terméke van jelen. Az innen induló transzlációt az 5' irányban 12 nukleotid távolságban lévő *lac*-riboszóma-kötőhely teszi lehetővé. Ebben a fehérjében (P31') a P31 polipeptidlánc N-terminálisához egy tíztagú idegen peptidlánc kapcsolódik. Az nem állapítható meg a gélelektroforetikus fehérjemintázatból, hogy az ORF1 eredeti start-kodonjától kezdődően szintetizálódó protein milyen mennyiségben van jelen. A tenyésztési tapasztalatok alapján a három plazmid közül a pERCHORF-ot találtam a legalkalmasabbnak a P31 nagy mennyiségű termeltetésére. Exponenciális fázisban történt indukció után órákig, akár egész éjszakán át tenyésztve extrém magas expresszió érhető el (5. ábra).



5. ábra. P31 szintézis pERCHORF és pVH1 plazmidokkal transzformált HB101 sejtekben különböző IPTG-koncentrációk hatására. 12%-os SDS-poliakrilamid-gélben elektroforetizált összfehérjék. 2 mM IPTG (A), illetve 0,2 mM IPTG (B) hozzáadása után 3 óra, 6 óra és 16 óra múlva.

Ha 0,2 mM IPTG-koncentrációval indukálom az expressziót a szokásos 1-2 mM helyett, ugyanolyan magas szintű P31 túltermelés érhető el, bár hosszabb idő után (5.B ábra). E tény nagy mennyiségű túltermelő sejt tenyésztése esetén fontos, takarékosági szempontból.

V.1.2. A P31 protein izolálása *E. coli*ből

Az izolálás egyes lépéseinek részletes leírása, az oldatok összetétele a IV.2.13. fejezetben található.

V.1.2.1. A P31 protein részleges tisztítása HB101 p418-23 törzsből

Az ismeretlen funkciójú protein izolálása volt a kutatócsoportba kerülésemtől az első feladat. A tisztítás módjának kidolgozását még a túltermelő plazmidok konstruálása előtt kezdtem meg, azok birtokában pedig addig gyűjtöttem tapasztalataimat hasznosítva, lényegesen gyorsabbá és hatékonyabbá vált a munka.

Az első lépés annak megállapítása volt, hogy a P31 citoplazmatikus vagy membránfehérje-e. A p418-23 plazmidot tartalmazó HB101 sejteket YTB tápfolyadékban korai stacioner fázisig tenyésztettem, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtöttem, F-pufferben szuszpendáltam és ultrahangozással feltártam. A membrán- és sejtfal-törmelekeket és az épen maradt sejteket ultracentrifugálással leüleptítettem. A felülúszót kétdimenziós poliakrilamid-

gélelektroforézissel vizsgáltam, a detergensekkel és fagyasztás-felolvasztás ciklusokkal feltárt HB101 (p418-23) és HB101 (p408-05) sejtek összfehérjéjét tartalmazó lizátumaival összehasonlítva. Megállapítottam, hogy a P31 ultrahangozás után az ultracentrifuga-felülúszóban van, tehát nem integráns membránfehérje. A további tisztítások során is ezt a feltérési módszert alkalmaztam.

Az ultracentrifuga-felülúszóból a DNS-t sztreptomycin-szulfátos precipitációval eltávolítottam, majd a fehérjekivonatot PC-pufferrel szemben dializáltam.

A dializált oldatot PC- pufferrel ekvibrált anioncserélő DEAE-cellulózra vittem fel, majd a kötődött fehérjéket 0-1 M növekvő koncentrációban NaCl-t tartalmazó PC pufferrel eluáltam. A frakciók OD_{280} értékei alapján, az egyes csúcsokhoz tartozó frakciókat egyesítve 2D gélelektroforézissel vizsgáltam. A P31 az oszlopon kötődött, kis NaCl-koncentrációnál eluálódott fehérjék között volt.

Ezután a P31 tartalmú oldatot PC-vel szemben dializáltam és PC pufferrel ekvibrált kationcserélő foszfocellulóz oszlopra vittem fel. 0-1 M NaCl-gradienssel eluáltam a fehérjéket, és az előbb leírt módon vizsgáltam az átfolyó és eluált frakciókat. A P31 az alkalmazott körülmények között nem kötődött a foszfocellulózhoz.

V.1.2.2. A P31 protein izolálása pER235ORF vagy pER23CHORF plazmiddal transzformált *E. coli*ból

A túltermelő törzsek igen megkönnyítették a tisztítást, bár a frakciók tesztelése nagy figyelmet igényelt. A fehérjét monomer-molekulasúlyuk szerint különítettem el SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel. A sejtfehérjék között nagy mennyiségben található néhány, a P31 től alig eltérő elektroforetikus mobilitású, fehérje. Megfelelő futtatási körülmények esetén azonban ezek a fehérjék szétválaszthatók és a P31-tartalmú frakciók biztonsággal azonosíthatók. Kontrollként minden gélen molekulasúly-markerek, az indukált sejtek lizátuma és az adott oszlopra felvitt fehérjeoldatból vett minta is szerepelt az oszlopon átfolyt vagy sóoldattal eluált frakciók mellett.

Első kromatográfiás oszlopként DEAE-cellulózt alkalmaztam, mivel már tudtam, hogy a P31 ehhez kötődik. Vezetőképességméréssel meghatároztam a frakciók sókoncentrációját. A P31 PC-vel ekvibrált DEAE-cellulózról 0,15-0,2 M NaCl-koncentráció között eluálódik.

A DEAE-oszlopkromatográfia P31-proteinben gazdag frakcióit egyesítettem és a választott második oszlop ekvibráló pufferével szemben dializáltam.

Amint a II. fejezetben írtam, egy ideig feltételeztük, hogy a P31 DNS-kötő fehérje. Ezért érdemesnek látszott megvizsgálni, hogy DNS-affinitás-kromatográfiával tisztítható-e. A fehérjeoldatot 0,1 M NaCl-t tartalmazó pufferben (B puffer) vittem fel agarózhoz kapcsolt kettős

szálú csirkevér-DNS-t tartalmazó oszlopra, az elúció 0,1-2 M NaCl-gradienssel történt. A P31-et az átfolyó oldat tartalmazta. Ezt az oszlopon nem kötődött fehérjéket tartalmazó oldatot ezután denaturált (egyszálú) DNS-agaróz oszlopra vittem. A P31 ezen az oszlopon sem kötődött.

A DNS-agaróz oszlopokon átfolyt (és ezáltal csak csekély mértékben tisztult) P31 tartalmú oldatot PC pufferrel szembeni dialízis után hidroxilapatit oszlopra vittem fel, amin a P31 megkötődött, majd 0-1 M NaCl-koncentrációgradiens alkalmazásakor 0,3-0,5 M [NaCl]-nál eluálódott. A tisztulás mértéke ezen az oszlopon igen nagy volt.

A DEAE-utáni P31 tartalmú oldat másik felét PC-vel szembeni dialízis után ω -aminopentil-agaróz oszlopra vittem. Az elúció PC-ben oldott NaCl 0-1 M koncentrációgradiensével történt. A P31-et a 0,05-0,25 M NaCl-koncentrációjú frakciók tartalmazták.

A P31 preparátum a hidroxilapatit kromatográfia után Coomassie Brilliant Blue-vel festett gél alapján becsülve legfeljebb 1-2% egyéb fehérjét tartalmazott. A preparátum N-terminális 10 aminosavának szekvenciáját egy berlini kutatólaboratóriumban meghatározták: egyezett a P31 elméletileg meghatározott aminosavszekvenciájával.

A még tisztább preparátum előállítása érdekében a következő izolálások során a DEAE-cellulóz- és a hidroxilapatit-kromatográfias lépések között ω -aminopentil oszlopkromatográfiát is végeztem. Egy későbbi tisztítás során a DEAE cellulóz kromatográfia után heparin-agaróz

oszlopra vittem a részlegesen tisztított P31-et, amely az oszlopon kötődött és 0,3-0,5 M NaCl koncentrációnál eluálódott. A kész preparátum tisztábbnak bizonyult, mint az előző tisztítások alkalmával. Ezért a későbbi tisztítások során heparin-agarózt használtam második oszlopként az ω -aminopentil-agaróz helyett. A P31 ugyan mindkét oszlopon csak kismértékben tisztul, de a heparin-agaróz kromatográfia során olyan fehérjéktől is elválasztódik, amelyekkel a hidroxilapatitról együtt eluálódna.

A P31 preparátumot 50% glicerinnel tartalmú pufferrel szemben dializáltam (tároló puffer), amelynek során a P31 koncentrációja kb. a háromszorosára nőtt. A dialízis befejezése után a preparátumot $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltam.

A tapasztalatok alapján a későbbi P31-izolálások tipikus menete röviden összefoglalva a következő (a címszavakhoz tartozó adatok a IV.2.13. fejezetben találhatóak):

Sejttenyésztés: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, intenzív levegőztetéssel gazdag tápfolyadékban. Indukció exponenciális fázisban 0,2-0,5 mM IPTG-vel, utána tovább tenyésztés 4-6 órán át. Egy preparáláshoz 4-6 l kultúrából 15-20 g sejtet nyertem (centrifugálás utáni nedves súly).

Sejtfeltárás ultrahangozással, ultracentrifugálás, DNS-eltávolítás streptomycin kicsapással

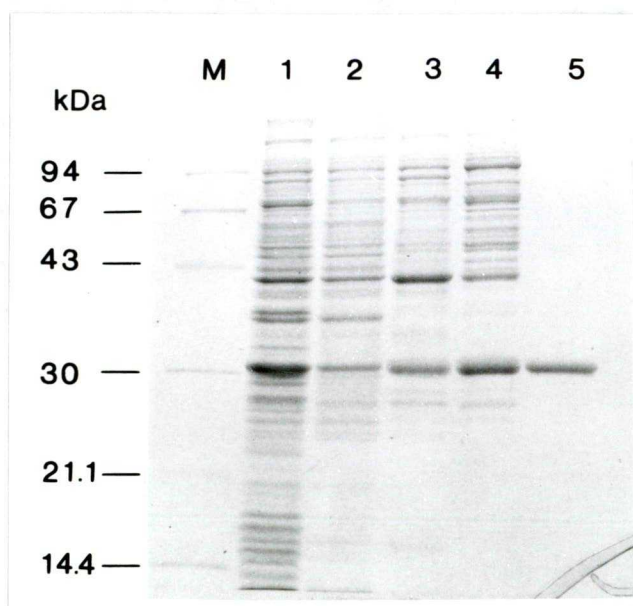
Kromatográfia a következő oszlopokon:

1. DEAE-cellulóz
2. Heparin-agaróz
3. Hidroxilapatit

Dialízis a tároló pufferrel szemben.

Általában 20 g (nedves súly) sejtből kiindulva 7-10 mg közel homogenitásig tisztított P31 proteint nyertem.

Az 5. ábra a P31 tisztulását illusztrálja egy átlagos izolálás egyes lépései során.



6. ábra. A P31 protein tisztulása az izolálás egyes lépései során. 12%-os SDS-poliakrilamid gélben elektroforetizált fehérjék. (1) Sejtfeltárás után. (2) Ultracentrifugálás utáni felülúszó. (3) DEAE-cellulóz oszlopkromatográfia után. (4) Heparin-agaróz oszlopkromatográfia után. (5) Hidroxilapatit-oszlopkromatográfia után. M: molekulásúly-markerek.

V.1.3. A P31 protein natív molekulásúlyának megállapítása

Az izolált P31 protein "géliszűrését" Sephacryl S-200 oszlopon végeztem, a IV.2.14. fejezetben leírt módon. Azonos oszlopon változatlan körülmények között végzett kromatográfiák reprodukálható adatai alapján a P31 natív molekulásúlya 62 kilodalton, amely a P31 aminosav-szekvenciából számított monomer-molekulásúlya (31,386 kDa)

szinte pontosan kétszerese. Tehát a P31 natív alegységszerkezete nagy valószínűséggel homodimer.

V.1.4. Poliklonális anti-P31 ellenanyag termeltetése kecskében

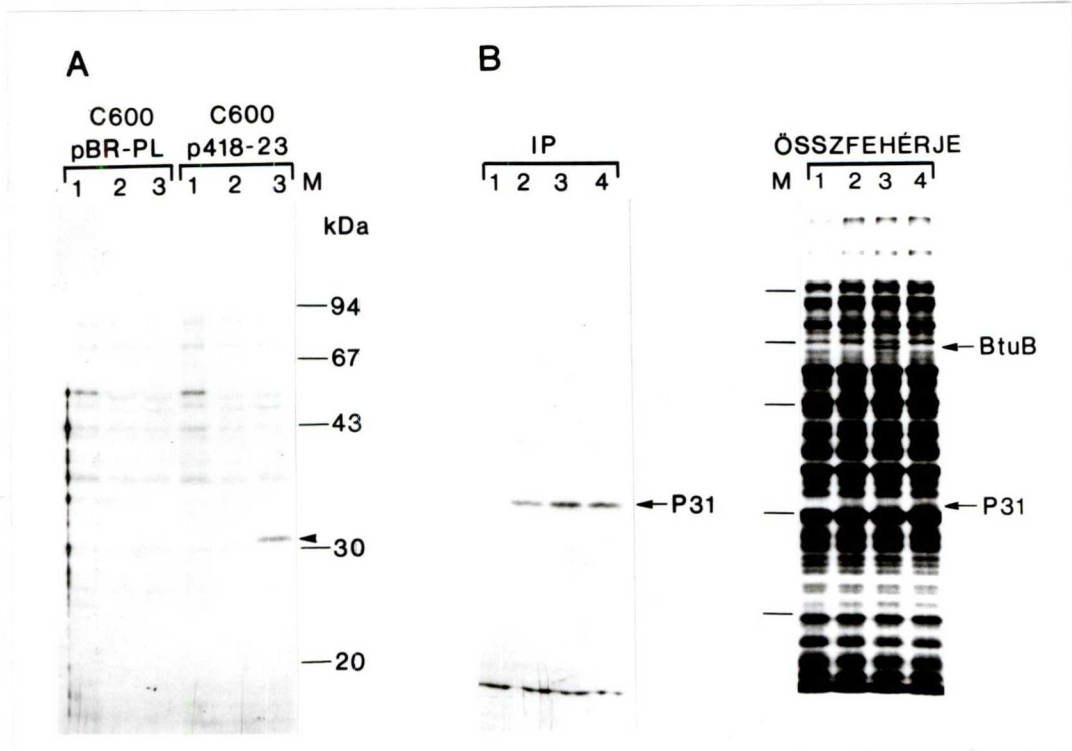
A poliklonális antiszérumot a IV.2.16. fejezetben leírt módon immunizált kecskéből nyertem. Az immunizáláshoz a nagyobb affinitású ellenanyag-képződés érdekében viszonylag kis mennyiségű P31 proteint használtam.

Az antiszérum jellemzésének céljából immunprecipitációt végeztem (IV.2. 17. fejezet). Az ORF1-et saját promotereiről expresszázó plazmidot tartalmazó sejtek és az ORF1-et csak a kromoszómán tartalmazó sejtek fehérjéit radioaktív izotóppal jelöltem *in vivo*. Mindegyik fajta lizátum azonos radioaktivitású adagjaihoz antiszérumot, illetve preimmun-szérumot adtam. Egy-egy adaggal az inkubációs lépéseket szérum hozzáadása nélkül végeztem.

A precipitátumok gélelektroforézise után készült autoradiogramon (7.A ábra) látható, hogy a P31-nek megfelelő méretű protein csak az antiszérummal inkubált C600 (p418-23) sejtfehérjék precipitátumában mutatható ki (az ábrán nyílhegyel jelölve). A P31-csíkon kívül - különösen igen hosszú expozíció után - annál jóval gyengébb intenzitású egyéb csíkok is látszanak az autoradiogramon. Ezek azonban valamennyi mintában, a szérum nélküliekben is jelen vannak, tehát a Sepharose-gyantához aspecifikusan adszorbált proteinekből áll ez a "háttér".

A 7.B. ábrán egy másik kísérlet eredménye látható, amelyet az ORF1-et a *btuB* génnel kapcsolatosan vagy anélkül tartalmazó plazmidokról *in vivo* képződött P31 mennyiségének összehasonlítása céljából végeztem.

A bemutatott vizsgálatok tükrözik, hogy a P31 proteinnel immunizált kecskéből nyert anti-P31 poliklonális antiszérum nagy specificitással reagál a P31 proteinnel.



7. ábra. A P31 immunprecipitációja *E. coli* C600 összfehérje-extraktumból anti-p31 poliklonális antiszérummal. *In vivo* radioaktív izotóppal jelölt fehérjék SDS-PAGE (12%-os gél) után készült autoradiogramok. (A) immunprecipitátumból eluált fehérjék szérum nélkül (1), preimmunszérummal (2), anti-P31 szérummal (3) végzett precipitációs kísérletben. (B) a P31 immunprecipitációja különböző plazmidokkal transzformált sejtekből: pBR-PL (1), p418-23 (2), pB021 (3), pB035 (4). A pB021 a *btuB* gént az ORF1-gyel átfedően tartalmazó kromoszmalis fragmentumot hordoz. A pB035 a *btuB* 3' végén csonka fragmentumát tartalmazza az ORF-től 5' irányban, a pB021-hez viszonyítva fordított orientációban. IP: immunprecipitátum.

V.2. Az ORF1 gén inaktiválása a kromoszómán

V.2.1. Kísérletek az ORF1 gén inaktiválására

Az ORF1-elrontási kísérletek az általánosan alkalmazott, plazmidon rezisztencia-markert tartalmazó DNS-szakasszal megszakított vagy helyettesített gén és környezete és a kromoszóma közötti reciprok homológ rekombináció elvén alapultak (Ruvkun és Ausubel, 1981). A rekombinációs plazmidtermék és a nem rekombinált plazmid-kópiák eliminálását az előbbiekkal inkompatibilis plazmiddal történő transzformálással próbáltam elősegíteni, a rekombinánsok azonosításának megkönnyítésére. A rekombinációhoz használt, antibiotikum-rezisztencia markert hordozó DNS inszerciójával inaktivált ORF1-gént és kromoszomális eredetű környezetét hordozó plazmidokat a p418-23-ból kétféle módon, *in vivo* transzpozonos mutagenézissel illetve *in vitro* rekombinációs módszerrel hoztam létre. Az előbbi esetben az ORF1 első néhány nukleotidja után beépült Tn5 transzpozont tartalmazó plazmiddal végzett rekombinációs kísérletben nem sikerült a kívánt rekombináns megtalálása (Balikó és mtsai, 1988). A kísérletet elvégeztem a Tn5-öt az ORF1-en kívül, a P1 P2 promoterek környékén tartalmazó plazmiddal is, és sikerült a reciprok homológ rekombináns előállítására. A Tn5 kromoszómára történő transzpozíciójának gyakorisága azonban körülbelül a tízszerese volt a

kettős rekombinációénak. A kromoszomális ORF1 génnel végzett rekombinációs kísérletek kudarcának oka vagy a megvizsgált klónok elégtelen száma, vagy az, hogy az ilyen rekombinánsok életképtelenek lennének. A Tn5-transzpozíció zavaró hatásának kiküszöbölésére a rekombinációs kísérletet megismételtem *in vitro* az ORF1 génbe beépített Km^R gént tartalmazó plazmiddal.

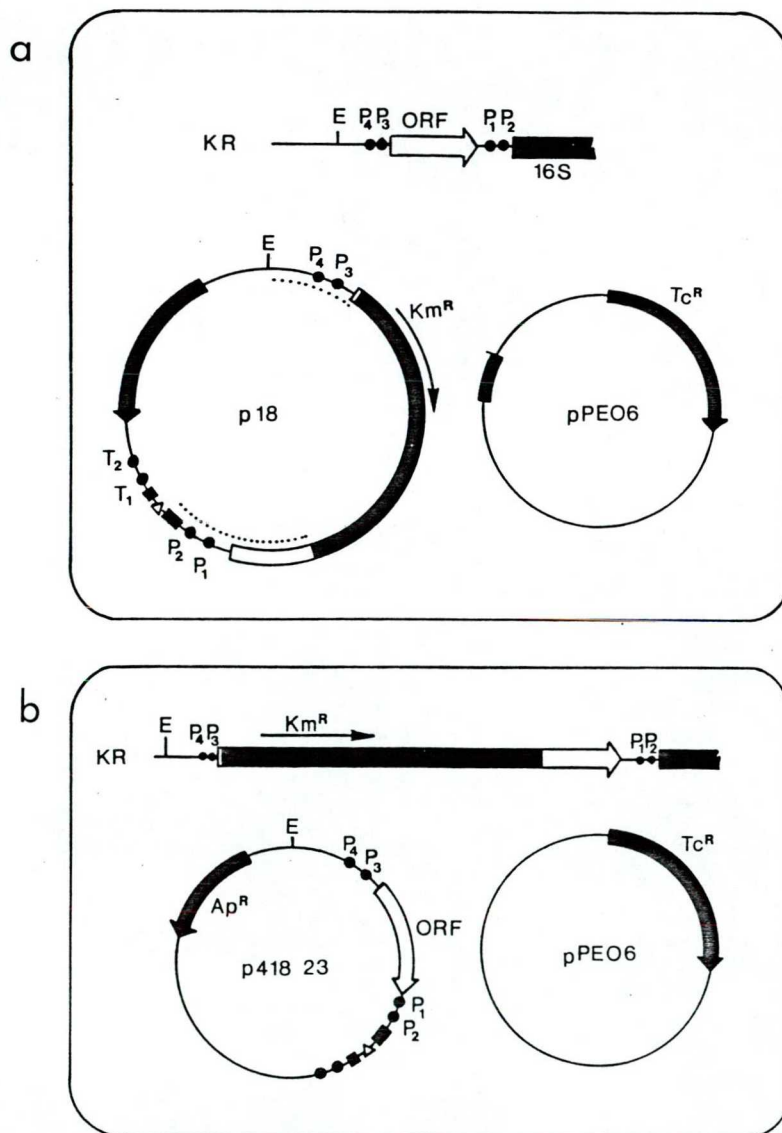
V.2.1.1. Kanamicin-rezisztencia-gént hordozó fragmentum inszerciója a p418-23 plazmidon lévő ORF1 génbe

A p418-23 plazmidot *Pst*I enzimmal részlegesen emésztettem, a linearizált plazmidot gélből izoláltam. A p418-23::Tn5-26 plazmidból (Balikó és mtsai, 1988) izoláltam a kanamicin-rezisztencia-gént hordozó 3,3 kb méretű *Hind*III fragmentumot. A *Hind*III fragmentum 3' végeit Klenow-polimerázzal feltöltöttem, a *Pst*I-fragmentum 5' egyszálú végeit a Klenow-polimeráz exonukleáz-aktivitását kihasználva leemésztettem. A tompa végeket tartalmazó fragmentumokat ligáltam. Transzformálás után a $Km^R Ap^R$ klónokból izolált plazmidok restriktív emésztésével megállapítottam a p418-23-ba épült fragmentum orientációját. A további rekombinációs kísérletekhez kiválasztott plazmid, a p18, vázlatos rajza a 8. ábrán látható: a kanamicin-rezisztencia gént tartalmazó fragmentum az ORF-ot az első néhány nukleotid után megszakítja, 5' oldalán 600 nukleotid, 3' oldalán kb. 1300 nukleotid hosszúságú

kromoszóma-eredetű, azzal homológ rekombinációra képes szakaszt tartalmaz.

V.2.1.2. Homológ rekombináns klónok keresése

A p18 plazmidot tartalmazó C600 sejteket a p18 plazmiddal inkompatibilis, tetraciklin rezisztencia-gént hordozó pPEO6 plazmiddal transzformáltam (8.a ábra), és



8. ábra. Kísérlet a kromoszomális ORF1 inaktíválására. (a) A sejtekben levő plazmidok a rekombináció előtt. (b) A sejtekben levő plazmidok a rekombináció után.

kanamicin-tetraciklin-rezisztens telepeket szelektáltam. Néhány kettős transzformánst kanamicin és tetraciklin tartalmú folyékony kultúrában tenyésztettem, majd plazmidot preparáltam belőlük. Az izolált plazmidok linearizálás utáni elektroforézisével kiválasztottam néhány klónt, amelyekben a p18 plazmiddal egyező méretű plazmid nem, vagy a pPE06-nál sokkal kisebb mennyiségben volt látható. Ezekkel a preparátumokkal HB101 sejteket transzformáltam, a sejtekből azonos mennyiségeket tetraciklint, kanamicint, vagy ampicillint tartalmazó lemezekre szélesztettem. Az egyik C600-ból izolált klón esetében míg a tetraciklint tartalmazó lemezen >500 telep jelent meg, a kanamicint tartalmazón egy sem, az ampicillines lemezen csak egy, amely Km^S volt. Plazmid izolálás és restrikciós analízis után kiderült, hogy a plazmid a p418-23. Ez arra utalt, hogy ebben a klónban a p18 rekombináció révén integrálódott a genomba, a plazmid-kompetíció során a p18 kópiák eltűntek. A populáció, amelyből a plazmidokat izoláltam, tartalmaz olyan sejteket, amelyekben egy újabb rekombinációs lépés után a Km^R marker a kromoszomális ORF-ot megszakítja, és az ép gén a rekombinációs plazmidterméken (p418-23) van jelen (8.b ábra).

A következő lépésben megpróbáltam kiválasztani azokat a reciprok rekombináns klónokat, amelyekből a p418-23 elveszett. A C600 klónt tovább tenyésztettem ampicillint nem, csak tetraciklint és kanamicint tartalmazó YTB-ben, majd (hígítás után) tetraciklint tartalmazó lemezekre

szélesztettem. A telepekről bársonnyal replikákat készítettem ampicillint tartalmazó lemezekre, és Ap^S klónokat kerestem. 10⁴ telep között nem volt ilyen klón, azaz a feltételezett kettős rekombináns sejtek továbbra is tartalmazták a p418-23 plazmidot Valószínűleg azért, mert annak elvesztése életképtelenné tenné a sejtet, vagy legalábbis szelekciós hátrányt okozna. Ez, az ORF1 esszencialitására utaló eredmény fokozta az ismeretlen funkciójú gén iránti érdeklődésemet, és érdemesnek láttam létrehozni egy feltételesen letális ORF1-mutánst.

V.2.2. Az ORF1 gén inaktiválása és esszenciális voltának bizonyítása új módszer segítségével

V.2.2.1. A módszer elve

Céljaim elérésére úgy próbáltam a rekombinációs módszert módosítani, hogy a rekombinánsok kiválasztása egyszerűbb legyen, könnyen el lehessen dönteni, hogy a helyettesíteni kívánt gén esszenciális-e. Ha igen, a gén megnyilvánulásának bizonyos körülmények közötti felfüggeszthetőségére van szükség, hogy a géntermék hiányának fenotipikus hatása esetleg élő sejtben vizsgálható legyen.

Egy igen egyszerű eljárást találtam ki: a rekombinációhoz hőérzékeny plazmidot alkalmazok, amely 30 °C-on képes replikációra, 42-43 °C-on pedig nem. A plazmid - akár az előző pontban leírt kísérletekben - homológ

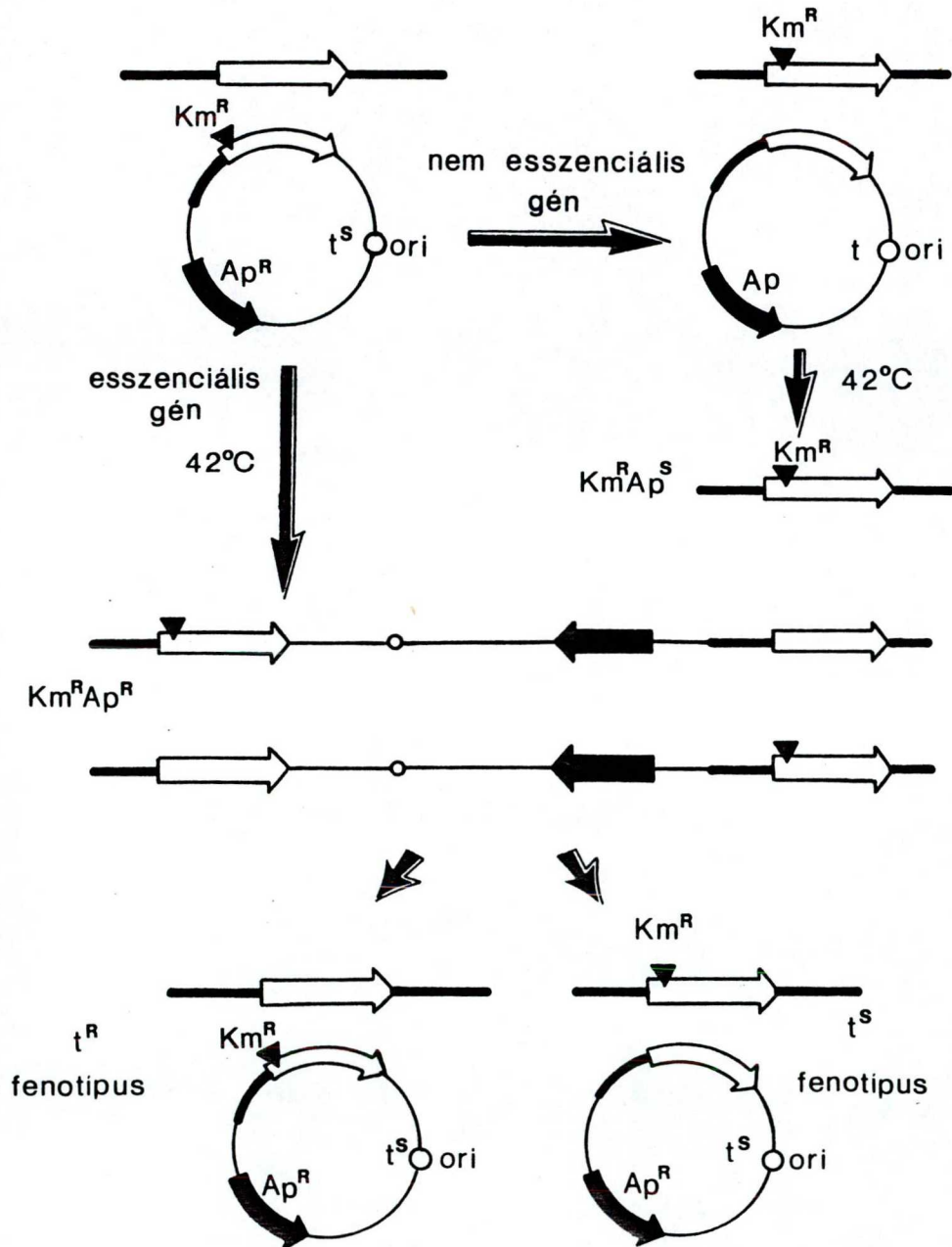


rekombinációra alkalmas kromoszóma eredetű génszakaszokat tartalmaz, antibiotikum-rezisztencia-gént hordozó fragmentummal megszakítva (vagy helyettesítve) a kicserélni kívánt gént. A választott hőszensitív plazmid a pSC101 replikont tartalmazza, alacsony kópiaszámú, ami biztosítja, hogy a rekombináció után a működőképes gén az eredetitől ne nagymértékben eltérő kópiában legyen a sejtben.

A rekombinációs eseményeket és a szelekciós lépéseket a 9. ábra illusztrálja. Nem esszenciális gének esetében a rekombinációs szelekciója a következőképpen történik: A rekombinációra alkalmas hőérzékeny plazmidot tartalmazó sejteket a plazmidon a genom eredetű részbe inszertált, rezisztenciát biztosító génnek megfelelő antibiotikumot tartalmazó lemezre széleszttem és 42 °C-on inkubálok. A lemezen csak olyan kolóniák jelenhetnek meg, amelyekben a rezisztencia-gén homológ rekombinációval a kromoszómára került. Könnyen eldönthető, hogy az egyes klónokban plazmid-integráció történt, vagy reciprok rekombináció, mivel az utóbbi esetben a klón a vektor által kódolt rezisztencia-génnek megfelelő antibiotikumra szenzitív. A rekombinációkor keletkezett plazmid-termék és az eredeti plazmid-kópiák elvesztek a sejtekből.

Ha a génről tudjuk, hogy esszenciális vagy éppen el szeretnénk dönteni, hogy az-e, a génhelyettesítést két lépésben kell végrehajtani: első lépésként a plazmid-tartalmú sejteket lemezre szélesztve 42 °C-on inkubálok,

a plazmidon az elrontani kívánt génbe inszertált rezisztencia-génnek megfelelő antibiotikum jelenlétében.



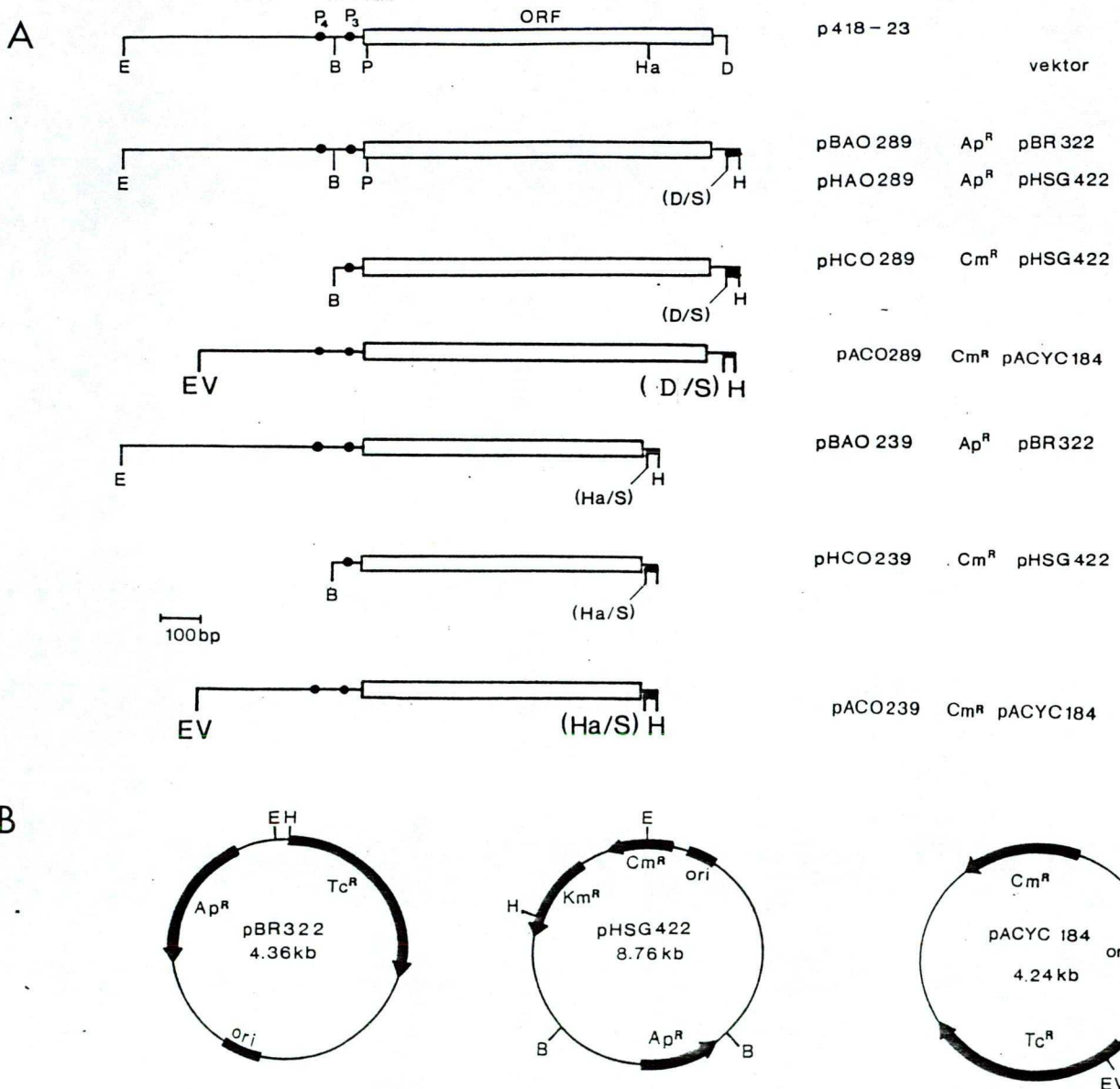
9. ábra. Kromoszomális gén inaktiválására és esszenzialitásának bizonyítására alkalmas új módszer elve. Magyarázat a szövegben. A rezisztencia-markert (itt Km^R) hordozó fragmentumot az ábrán sötét háromszög jelöli.

Esszenciális gén esetében csak azok a sejtek képezhetnek kolóniát, amelyekben a plazmid egy kópiája a kromoszómába integrálódott homológ rekombináció révén. Ezek a klónok a vektor-kódolta rezisztencia-gén által meghatározott további antibiotikumra is rezisztensek. A következő lépésben az integránsok további tenyésztése során az utódgenerációkban olyan sejteket kell keresni, amelyekben egy második rekombináció során a plazmid oly módon lépett ki a kromoszómából, hogy az elrontott allél maradt a kromoszómán és az ép került a hőszensitív plazmidra. Ezek a rekombinánsok antibiotikumok hiányában is hőérzékeny fenotípusúak. Kiválasztásuk a 30 °C-on inkubált lemezekon nőtt telepek replikájával történhet. A replikákat 30, illetve 42 °C-on inkubálva az utóbbin kevésbé növő klónok a kettős rekombinánsok.

V.2.2.2. A kísérletek során használt plazmidok konstrukciója

Az ORF1 és környékének átklónozásakor - a p418-23 plazmidból a hőérzékeny plazmidba - technikai nehézséget okozott, hogy az *rrnB* P1 és P2 promoterének jelenléte a plazmidot instabillá teszi az *rrnB* transzkripció terminátorok hiányában. Annak érdekében, hogy az ORF1 a P1 P2 nélkül egyszerűen átvihető legyen bármilyen vektorba, egy pBR-származék szubklónt készítettem. A pBR322 vektor *EcoRI-HindIII* helye között lévő szekvenciát helyettesítettem a pUC12 plazmidból származó polilinker-

szekvenciával. E pBR-PL-nek nevezett vektor *EcoRI-SmaI* helyére klónoztam a p418-23 1,5 kb *EcoRI-DraI* fragmentumát. Az így létrehozott pBAO289 plazmidban (10. ábra) az ORF1 mögül hiányzik a P1 és a P2 promoter, viszont jelen van néhány restrikciós enzim hasítóhelye.



10. ábra. A rekombinációs és a plazmid-helyettesítési kísérletekben alkalmazott plazmidok jellemzői. (A) Az egyes plazmidokba beépített p418-23 eredetű fragmentumok. (B) A vektorok vázlatos szerkezete. A plazmidok létrehozása során alkalmazott restrikciós enzimek hasítóhelyei: B *BstEII*, D *DraI*, E *EcoRI*, EV *EcoRV*, H *HindIII*, Ha *HaeIII*, P *PstI*, S *SmaI*. Az (A) vázlatokon vastag vonallal jelölve: polilinker-szekvencia.

A p18 plazmid 4,8 kb *EcoRI-DraI* fragmentumát is átklónoztam a pBR-PL-be, annak *EcoRI-SmaI* végéhez ligálva (pBKO289).

Mindkét pBR-PL származék plazmidból a kromoszomális eredetű részt átklónoztam a hőszenszítív replikációjú pHSG422 plazmidba (Hashimoto-Gotoh és mtsai, 1981). A plazmid vázlatos rajza a 10.B ábrán látható. pSC101 replikont tartalmaz, alacsony kópiaszámú (6-8), háromféle antibiotikum-rezisztenciát biztosító gént hordoz, mindegyikben egyedi restriktációs enzim-felismerőhely található.

Az ép ORF1 gént tartalmazó 1,5 kb *EcoRI-HindIII* pBAO289-fragmentumot a pHSG422 7 kb *EcoRI-HindIII* fragmentumához ligáltam, létrehozva a pHAO289 plazmidot (10. ábra), amelyen a három rezisztencia gén közül csak a β -laktamáz gén maradt működőképes. Az elrontott ORF1 gént tartalmazó pBKO289 plazmid 4,8 kb *EcoRI-HindIII* fragmentumának és a pHSG422 7 kb *EcoRI-HindIII* fragmentumának ligálásával létrejött a pHKO289 plazmid, amely az ampicillin-rezisztencia génen kívül a nem pHSG-eredetű kanamicin-rezisztencia gént is tartalmazza.

Csak egyetlen plazmid, a pHKO289 szükséges ahhoz, hogy a fent vázolt rekombinációs kísérletet elvégezzem. Későbbi terveim között szerepelt, hogy megpróbálom a hőérzékeny rekombináns sejtekben az ép ORF1 gént hordozó plazmidot az ORF1 gén különböző mutánsait hordozó plazmidokra cserélni, amelyek segítségével esetleg a

génszerkezet-funkció összefüggése vizsgálható lesz. Az e célból elkészített plazmidok a következők:

A pBAO289 1 kb *BstEII-HindIII* fragmentumának és a pHSG422 5 kb *BstEII-HindIII* fragmentumának ligálásával előállítottam egy az ORF1-et tartalmazó hőszenszítív plazmidot (pHCO289), amelyen a pHAO289-től eltérően nem az ampicillin-rezisztencia-gén, hanem a kloramfenikol-rezisztencia-gén található, és az ORF1 gén egyik promotere hiányzik. A pHSG422-ből a 2 kb *BstEII* fragmentum deléciójával készítettem egy olyan származékot, amely a kloramfenikol rezisztencia gént tartalmazza, de az ampicillin rezisztencia gént nem (pHSG-B).

3' végén csonka ORF1-et tartalmazó pBR- és pHSG-származék plazmidokat is készítettem., mivel egy korábbi kísérlet e mutáns megváltozott (vagy hiányzó) funkciójára utalt. E korábbi kísérletben a p418-23 1,3 kb *EcoRI-HaeIII* fragmentumát - amelyről az ORF1 utolsó 150 nukleotidja hiányzik - a nagykópiaszámú pHCG24 plazmid (Boros és mtsai, 1984) *EcoRI-SmaI* helyéhez ligáltam (pHCEB). Ebből a plazmidból helyeztem át az 1,3 kb fragmentumot *EcoRI-HindIII* enzimekkel történt kihalás után pBR322-be, annak *EcoRI* és *HindIII*-helyéhez ligálva (pBAO239). A pHCEB 0,8 kb *BstEII-EcoRI* fragmentumát a pHSG422 5 kb *BstEII-HindIII* fragmentumához ligáltam, létrehozva a kloramfenikol-rezisztencia gént hordozó pHCO239 plazmidot. A plazmidon az ORF1 génnek csak az egyik

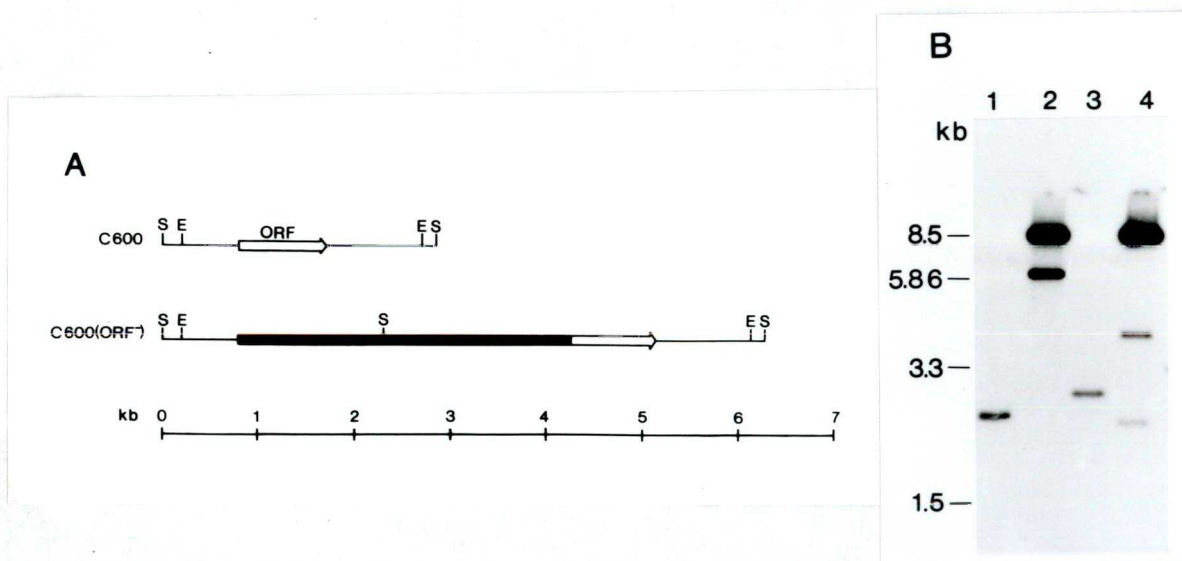
promotere van jelen. A csonka gént tartalmazó plazmidok jellemzőit a 10. ábra mutatja.

Az ORF1-et a pACYC184 plazmidba is átklónoztam: a *EcoRV* és *HindIII* enzimekkel emésztett vektorba beépítettem a pBAO289 1,33 kb *EcoRV-HindIII* fragmentumát (pACO289), illetve a pHCEB 1,13 kb *EcoRV-HindIII* fragmentumát (pACO239); 10. ábra.

V.2.2.3. Az ORF1 gén inszerciós inaktiválása és a rekombináns klónok analízise

A kísérletet az esszenciális gének esetében alkalmazandó stratégiával végeztem. C600 sejteket pHKO289 plazmiddal transzformáltam. A szélesztés után 30 °C-on nőtt, $Km^{R}Ap^{R}$ transzformáns telepek közül néhányat folyékony kultúrában tenyésztettem, majd lemezenként különböző számú sejtet (10^2 - 10^6 sejt/lemez) kanamicin tartalmú YTA táptalajra szélesztettem és 42, illetve 30 °C-on inkubáltam. 42 °C-on a szélesztett sejtek számához, illetve a 30 °C-on azonos sejtszámból képződött kolóniák számához viszonyítva kb. 10^{-4} arányban jelentek meg telepek. Valamennyi $Km^{R}Ap^{R}$ volt, tehát a feltételezésnek megfelelően valószínűleg plazmid-integránsok. Hat ilyen klónt kanamicint tartalmazó folyadék kultúrában 30 °C-on tenyésztettem, majd kb. 300 sejt/lemez mennyiségeket kanamicin tartalmú YTA táptalajra szélesztettem és 20 órán át 30 °C-on inkubáltam. A kinőtt telepeket átszűr-káltam 2-2 YTA lemezre, amelyek közül az egyiket 30 °C-

on, a másikat 42 °C-on inkubáltam azonos ideig. 500 klón közül kettő olyat találtam, amely 42 °C-on kisebb telepet alkotott, mint 30 °C-on. Ezekről feltételezhető volt, hogy az előállítani kívánt reciprok rekombinánsok. Annak oka, hogy az átszűrt sejtek 42 °C-on is látható tömeg eléréséig szaporodtak, valószínűleg az, hogy a pálcikáról a lemezre került viszonylag nagyszámú sejt a plazmid kópiák kihígulásáig, azaz néhány osztódáson át életképes. A két hőszenzitív, 30 °C-on kanamicin és ampicillin rezisztens klón össz-DNS-ét Southern-hibridizációval analizáltam. Mindkét klónban mind az ORF1-hibridizációs



11. ábra. Egy C600(ORF⁻) pHA0289 rekombináns klón Southern-analízise. (A) A kromoszóma ORF-környéki részének *EcoRI* és *SalI* restriktációs térképe a rekombináció előtt és után. (B) 1%-os agaróz gélben elektroforetizált össz-DNS fragmentumok Southern transzfer és hibridizáció után készült autoradiogramja. (1,3) C600 össz-DNS, (2,4) C600(ORF⁻) pHA0289 össz-DNS. *EcoRI*- (1, 2) illetve *SalI*- (3,4) emésztett minták. Hibridizációs próba: a pBA0289 ORF1-et tartalmazó 1,5 kb *EcoRI*-*HindIII* fragmentuma.

próba, mind a Tn5 Km^R génjét tartalmazó próba egy 5,8 kb méretű EcoRI fragmentumhoz hibridizál, amely megfelel a 3,3 kb Tn5 eredetű fragmentum és a vad típusú klónban 2,5 kb méretű, az ORF1 gént tartalmazó fragmentum méretösszegének. Az ORF-próba kimutatta az ép ORF-ot hordozó rekombinációs plazmid-termék jelenlétét is, amely az *in vitro* rekombinációval létrehozott pHAO289 plazmiddal megegyező méretű. A 11. ábrán az egyik klón össz-DNS-ének EcoRI, illetve Sall emésztés után készült Southern-hibridizációjának eredménye látható.

V.2.2.4. A mutánsok fenotípusa

A hőérzékeny klónt C600(ORF⁻) pHAO289-nek neveztem el (az *in vivo* rekombináció eredményeként keletkezett plazmid struktúrája az *in vitro* szerkesztett pHAO289 plazmiddal azonos). A klón fenotípusát lemezekon nőtt telepeken, illetve azok sejtjein vizsgáltam különböző hőmérsékleteken, a vad típusú C600 törzsszel összehasonlítva.

30 °C-on az YTA táptalajra szélesztett mutáns sejtek telepképző képessége és a telepek morfológiája azonos a vad típuséval. 42 °C-on a mutáns sejtekből nem képződik látható kolónia. A szélesztett sejtek számához viszonyítva kb. 10⁻⁴ gyakorisággal megjelenő kolóniák mind ampicillin rezisztens, ép ORF1-gént tartalmazó plazmid-integránsok, amit Southern-analízisük is igazolt.

A mutáns viselkedése a plazmid-replikáció számára permisszív, illetve nonpermisszív hőmérséklet közötti

tartományban ígérkezett a legizgalmasabbnak. Itt ugyanis, a plazmid csökkent replikációképessége miatt, feltételezhető, hogy miközben az osztódások során át kihígul a sejtekből, találhatóak olyan generációk, amelyekben az ORF1 gén terméke a vad típushoz viszonyítva kisebb mennyiségben van jelen, és ez a sejt működésében zavarokat okoz.

37 °C-on az YTA táptalajra szélesztett (kb. 300 sejt/lemez) mutáns sejtek telep formáló képessége csak kismértékben csökkent, a kolóniák morfológiája azonban igen heterogén. Számos, a vad típushoz hasonló állagú és színű normális vagy annál kisebb méretű telepen kívül található néhány nagy, laza szerkezetű, áttetsző telep. Előfordulnak továbbá szegmentált telepek, amelyeknek egy-egy szelvénye laza szerkezetű. A heterogenitás valószínűleg a plazmid kópiák egyenlőtlen eloszlásából és ingadozó "elvesztési sebességéből" adódik az osztódások során, amiből következően akár azonos telepen belül is létezhetnek P31 proteín hiányos sejtcsoportok a proteint normális mennyiségben tartalmazók mellett.

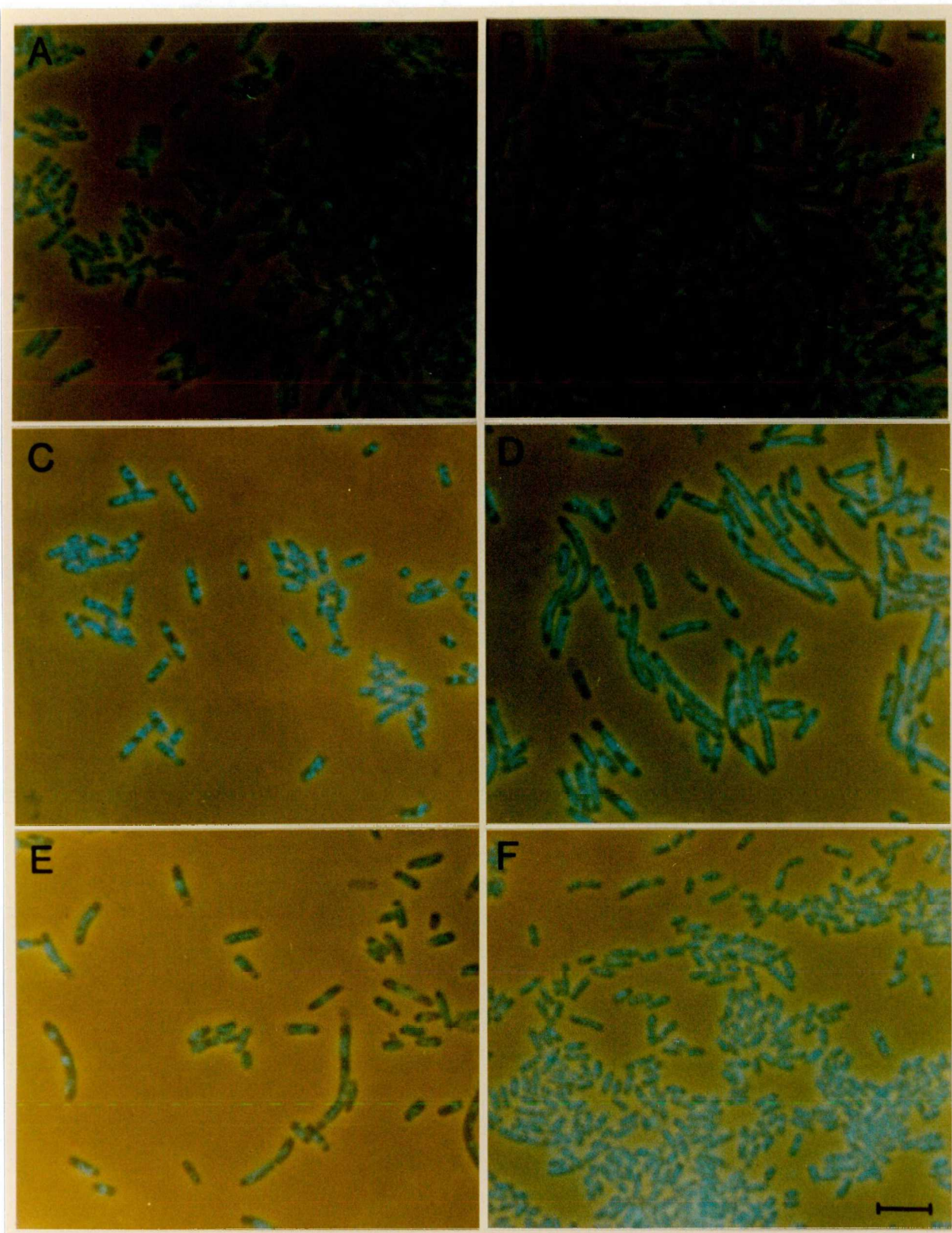
Az esetleges sejt-alakváltozás kimutatására a telepekből vett mintákat megvizsgáltam fáziskontraszt mikroszkóppal. Az áttetsző telepekben a vad típusúnál jóval változatosabb hosszúságú sejtek találhatóak, többségük a vad típusúnál hosszabb, néhányuk fonalszerű.

Ez a fenotípus valamilyen sejtosztódási zavarra utal, ami jelezheti azt, hogy az ORF1 gén a szeptumképződésben játszik szerepet, de az sem kizárható, hogy a génnek

valami más funkciója van, és hiánya csak közvetett módon okozza a sejtosztódás gátlását. Mivel a DNS-szintézis zavara vagy replikálódó kromoszómák szétválásának gátlása is a sejtosztódás gátlásához vezet (részletesebben lásd az VI. fejezetben), kíváncsi voltam a mutáns sejtek nukleoid-morfológiájára. A fixált sejtek nukleoidjait a fluoreszcens 4',6-diamidino-fenilindollal (DAPI) festettem, és a S. Hiraga által kidolgozott fluo-phase mikroszkópos technikával vizsgáltam (Hiraga és mtsai, 1989). Ez a szellemes módszer látható fényvel történő fáziskontraszt megvilágítás és UV-megvilágítás kombinációjával lehetővé teszi a sejt-alak és a nukleoidok eloszlásának egyidejű észlelését. A mikroszkópos fotókon látható, hogy a hosszú sejtek többségében a nukleoidok szinte az egész sejtet kitöltve helyezkednek el, folyamatosnak tűnő láncot alkotva (12.B ábra).

V.2.2.5. Plazmid-helyettesítési kísérletek hőérzékeny plazmidokkal

A C600(ORF⁻) pHA0289 törzsben az ORF1 gént és ampicillin rezisztencia gént tartalmazó plazmidot megpróbáltam kicserélni különböző hőszenszítív, kloramfenikol rezisztenciát meghatározó plazmidokra. Ezek közül az egyik (pHCO289) a teljes ORF1-et hordozta a P4 promoterral, a másik (pHCO239) a 3' delécióval ORF1-gént, a harmadikon (pHSG-B) az ORF1 nem volt jelen. A mutáns törzset a kloramfenikol rezisztens plazmidok valamelyiké-



12. ábra. Sejt- és nukleoidmorfológia vizsgálata fluoreszcens-fáziskontraszt mikroszkóppal DAPI-festés után. A sejtek YTA táptalajon a jelzett ideig és hőmérsékleten nőtt telepekből származnak. (A) C600(ORF⁻) pHA0289, 30 °C 20 óra; (B) C600(ORF⁻) pHA0289, 37 °C 16 óra; (C) C600(ORF⁻) pHCO289, 30 °C 20 óra; (D) C600(ORF⁻) pHCO289, 37 °C 16 óra; (E) C600 pHCO289 37 °C 32 óra; (F) C600, 37 °C 16 óra. Valamennyi fotó azonos nagyítású. A vonal az F panelen 5 μm-t jelöl.

vel transzformáltam. A kétféle plazmidot tartalmazó transzformánsokat kloramfenikolt tartalmazó YTB tápfolyadékokban tenyésztettem 30 °C-on, majd kloramfenikolt tartalmazó YTA táptalajra szélesztettem. A kinőtt telepekről replikákat készítettem ampicillint, illetve kloramfenikolt tartalmazó táptalajokra, és ampicillin szenzitivitást kerestem. A pHC0289 plazmiddal transzformált sejtek 90 %-a ampicillin szenzitívvé vált. A pHSG-B-vel transzformált sejtek utódai között nem találtam Ap^S klónt, ami összhangban van az ORF esszencialitását bizonyító eredményekkel. A pHC0239 plazmiddal transzformált sejtek is megőrizték a pHA0289 plazmidot, ami arra utal, hogy a csonka P31 protein nem tudja ellátni funkcióját.

A C600(ORF⁻) pHC0289 törzs fenotípusa a pHA0289 plazmidot tartalmazó C600(ORF⁻)-éhoz igen hasonló. A különbség csak annyi, hogy az előbbi 37 °C-on nagyobb gyakorisággal képez áttetsző telepeket, és azok sejtjei között nagyobb az igen hosszúak aránya. E fonálszerű sejtekben a nukleoidok összefüggő, gyakran cikk-cakkos láncszerű eloszlása még jobban megfigyelhető (12.D ábra). Ez feltételezhetően azért van így, mert az egy promoterről az ORF1 gén kisebb mértékben expresszálódik, és 37 °C-on azonos számú osztódás után a P31 protein szintje alacsonyabb lehet, mint az ORF1 mindkét promoterét hordozó pHA0289 esetében. Így a mutáns fenotípus megfigyelésére kényelmesebb a pHC0289 plazmidot tartalmazó törzset használni.

Ha a C600(ORF⁻) pHCO289 kolóniákat a szokásos 12-16 óránál hosszabb ideig, 32 óráig inkubálok 37 °C-on, a telepeket alkotó sejtek mikroszkópikus képe az előbbtől eltérő (12.E ábra). A telepekben sok, a vad típushoz hasonló, tömzsi pálca alakú sejt található. A hosszabb sejtekben a nukleoidok több különálló tömeget alkotnak, egyes sejteken a szegregálódott nukleoidok közötti részen befűződés látható. A fluo-phase technika lehetővé teszi lizált sejtek vázának kimutatását is. A mintában megfigyelhetők ilyen, citoplazmát és DNS-t nem tartalmazó, halvány sejt-vázak, és néhány hosszabb sejt pólusa is lízisre utalóan elhalványodott. Egy-két duzzadt átmérőjű sejt is található. Úgy látszik, a P31 protein mennyiségének további csökkenése a sejtfal meggyengüléséhez és ugyanakkor a nukleoidok szegregációra képes állapotának részleges helyreállításához vezet. A szegregálódott kromoszómák jelenléte az "öreg", többségében már nem stacioner szaporodási fázisban levő sejtet tartalmazó telepben arra is utalhat, hogy bár a folyamat a mutánsokban lelassult a vad típushoz viszonyítva, de hosszú osztódási periódus esetén végbemehet. Talán ez magyarázata annak is, hogy aminosavakkal kiegészített minimál táptalajon, amely az YTA-nál lassúbb szaporodást tesz lehetővé, a pHCO289 vagy PHAO289 plazmidokat tartalmazó C600(ORF⁻) sejtek 37 °C-on a vad típushoz hasonló morfológiát mutatnak. (42 °C-on nem képeznek telepet minimál táptalajon sem.)

V.2.2.6. Plazmid-helyettesítési kísérletek hőstabil plazmidokkal.

A C600(ORF⁻) pHC0289 sejteket ampicillin rezisztencia gént hordozó, nem hőszenszítív második plazmiddal transzformáltam. A pBA0289 plazmiddal transzformált C600(ORF⁻) sejtek telep- és sejt morfológiája a vad típuséval volt azonos 30, 37 és 42 °C hőmérsékleten. A mutáns fenotípus komplementálhatósága a plazmidon a sejtbe vitt ORF1 génnel bizonyítja, hogy a mutáns fenotípusát nem valami más, az ORF-on kívüli mutáció okozza.

A pBR-PL plazmid természetesen nem komplementálta a mutáns fenotípust, sőt a transzformánsok telepképző képességét 37 °C-on csökkentette.

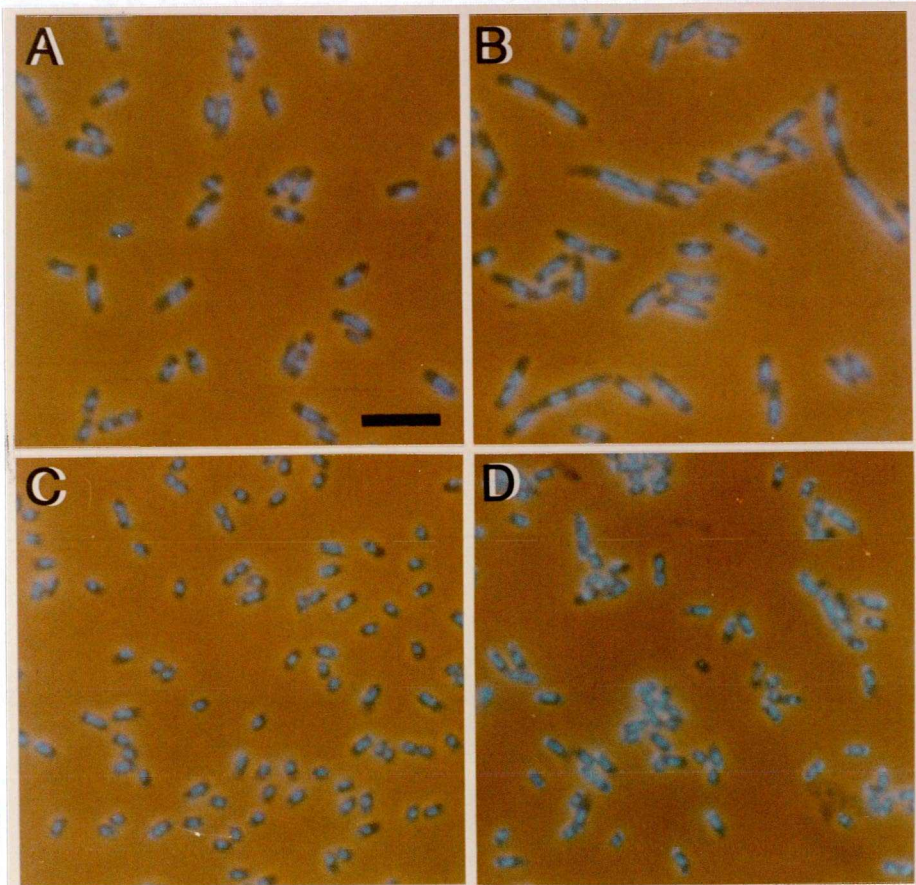
A pBA0239 plazmiddal transzformált sejtek 37 °C-on szintén a mutáns fenotípust mutatták, ami megerősítette a hőszenszítív plazmid-kompetíciós kísérlet következtetését, hogy a csonka gén terméke csökkent aktivitású. Meglepő volt azonban a transzformánsok viselkedése 42 °C-on: kanamicint és ampicillint tartalmazó lemezen a szélesztett sejtszámhoz viszonyítva kb 10^{-2} arányban ráncos szegélyű telepek jelentek meg, amelyek kloramfenikol szenszítívek voltak. Az ezekből a telepekből tenyésztett folyadékkultúra sejtjeit lemezre szélesztve és 37 °C-on inkubálva a vad típustól nem különböző morfológiájú telepek képződtek.

A transzformálást és szélesztést többször megismételtem, azonos eredménnyel. Azonosan viselkedtek a

C600(ORF⁻) pHA0289 sejtek is pAC0239 plazmiddal történő transzformálás után. 42 °C-on a szélesztett sejtekből kb. 10⁻² gyakorisággal képződtek telepek, ampicillin szenzitivék voltak, azaz nem tartalmazták a teljes ORF1 gént hordozó plazmidot. A kétféle plazmid-párost tartalmazó C600(ORF⁻) sejtekből származó, az ORF1-et hordozó hőszenszitiv plazmidot elveszített klónok csoportjainak a [C600(ORF⁻)** pBA0239] illetve [C600(ORF⁻)* pAC0239] ideiglenes nevet adtam. A klónokat további vizsgálatuk során a pBR-PL vagy pBA0239, illetve a pACYC184 vagy pAC0239 plazmiddal transzformált C600 sejtekkel hasonlítottam össze. (A pBA0239 vagy a pAC0239 plazmid a vad típusú sejt fenotípusát nem változtatta meg).

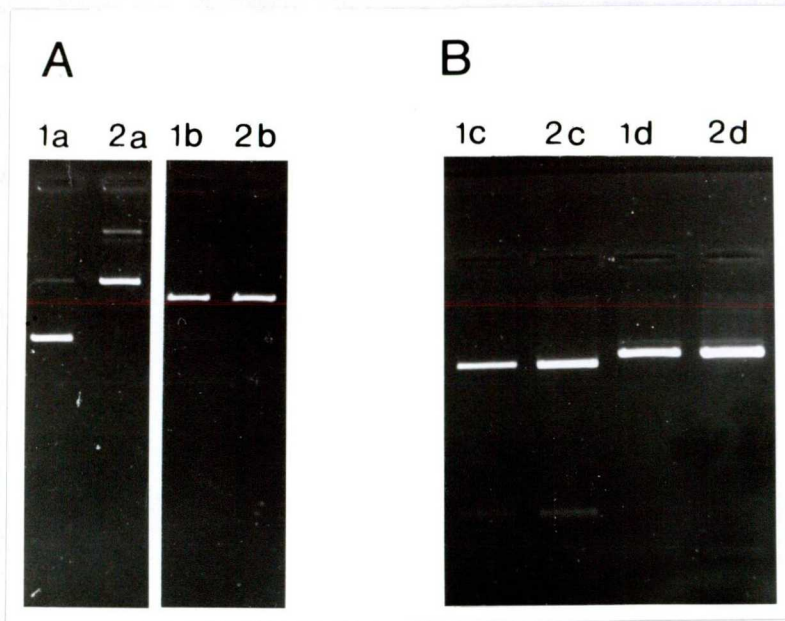
YTB-ben vagy minimál tápfolyadékban tenyésztve 37 °C hőmérsékleten, a növekedési görbe a C600 törzsével azonos alakú volt, az azonos sűrűségű kultúrákból szélesztett vad típusú sejtekből azonban 1,5-2-szer több telep képződött. Az YTB-ben tenyésztett kultúrából vett minták mikroszkópos képen látható (13. ábra), hogy a sejtek alakja lényegesen különböző a C600 sejtekétől: az exponenciálisan szaporodó tenyészetből vett mintákban a [C600(ORF⁻)* pAC0239] mutáns sejtek megnyúltak, a nukleoidok szegregálatlanul, fonalszerű tömegekben töltik ki a sejteket (13.B ábra). A stacioner fázisú sejtek a vad típusú (13.C ábra) kerek alaktól eltérően pálca alakúak (13.D ábra). A mutáns sejtek fenotípusa az eredeti, az ORF1 gént hőszenszitiv plazmidon expresszáló

C600(ORF⁻) klón 37 °C-on megfigyelt tulajdonságaira emlékeztet, bár a sejtek az előbbieken kevésbé megnyúltak. M9 tápfolyadékban a sejtalak csak kisebb mértékben tér el a vad típustól.



13. ábra. Sejt- és nukleoidmorfológia vizsgálata fluoreszcens-fáziskontraszt mikroszkóppal, DAPI-festés után. A sejtenyésztés YTB tápoldatban történt, 37 °C-on. (A) Exponenciális növekedési fázisú C600 pACYC184 sejtek. (B) Exponenciális növekedési fázisú C600(ORF⁻)* pACO239 sejtek. (C) Stacioner növekedési fázisú C600 pACYC184 sejtek. (D) Stacioner növekedési fázisú C600(ORF⁻)* pACO239 sejtek. A vonal 5 μm-t jelez.

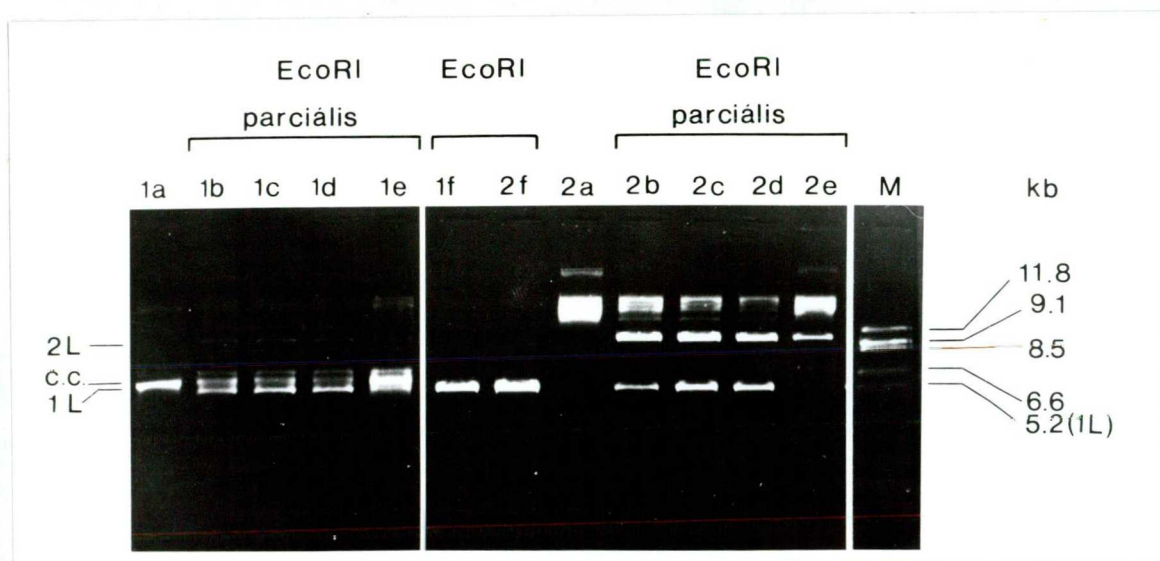
A C600(ORF⁻)* és C600(ORF⁻)** sejtekből izolált plazmidok elektroforetikus mobilitása nagymértékben különbözik a vad típusú sejtekből izolált plazmidokétól (14.A ábra 1a, 2a). Különböző restriktív enzimekkel



14. ábra. C600 és C600(ORF⁻)* sejtekből izolált pAC0239 plazmidok gélelektroforetikus mobilitása. (1) C600 sejtekből izolált plazmid. (2) C600(ORF⁻)* sejtekből izolált plazmid. (a) emésztetlen preparátum. (b) *EcoRI* emésztés után. (c) *PstI-HindIII*-emésztés után. (d) *SacII* emésztés után. (A) 1%-os agaróz gél. (B) 1,5 %-os agaróz gél. Az (A) gélt az elektroforézis után festettem ethidium-bromiddal.

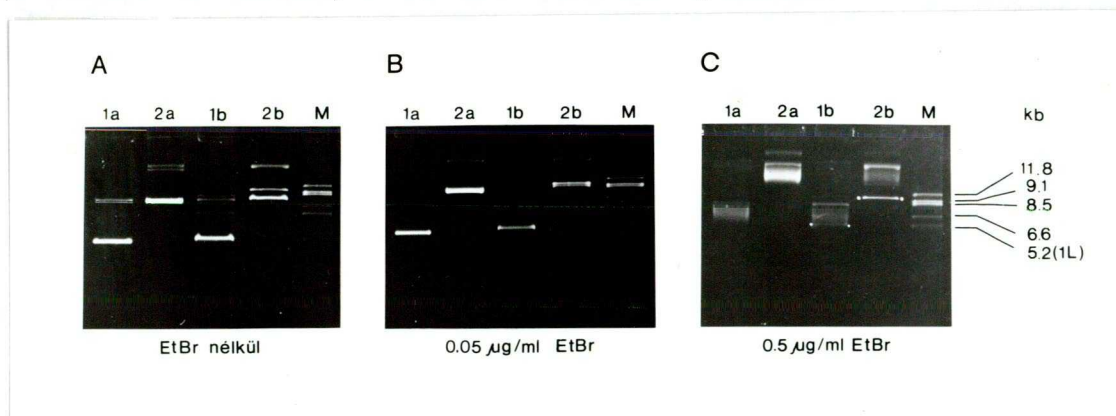
történő emésztések után a fragmentumok mérete megegyezik a C600-ból izolált, azonos enzimekkel emésztett azonos plazmidokéval (14.A ábra 1b, 2b; 14.B). Ezen elektroforetikus viselkedés egyik lehetséges magyarázata, hogy az emésztetlen mintákban több plazmidmolekula kapcsolódik egymáshoz: vagy egymásba láncolódnak, vagy multimereket alkotnak. Annak eldöntésére, hogy a mutánsból izolált plazmid multimer szerkezetű-e, parciálisan emésztettem *EcoRI* enzimmal, amelynek egy hasítóhelye van a plazmidmonomeren. A részleges emésztést kétféleképpen végeztem: a plazmidokat kis mennyiségű *EcoRI*-gyel inkubálva,

illetve ethidium-bromidot tartalmazó reakcióelegyhez adtam az *EcoRI* enzimet. (EtBr jelenlétében a plazmid-linearizálás végbemegy, a lineáris fragmentumok további enzimatis hasítása azonban gátlódik). A 15. ábrán látható, hogy a mutánsból izolált parciálisan emésztett plazmidpreparátumokban nagy mennyiségben található egy körülbelül kétszeres momomer-méretnek megfelelő mobilitású DNS (15. ábra 2b-e). E "2L" DNS a vad törzsből preparált, parciálisan emésztett preparátumban is kimutatható, de itt a monomer-fragmentumhoz viszonyítva jóval kisebb mennyiségben (15. ábra 1b-e).



15. ábra. C600 és C600(ORF⁻)* sejtekből izolált pACO239 plazmidok gélelektroforetikus mobilitása 1%-os agaróz gélben *EcoRI* parciális emésztés után. (1) C600 sejtekből izolált plazmid. (2) C600(ORF⁻)* sejtekből izolált plazmid. (a) Emésztetlen, supercoiled plazmid. (b, c, d) 0,5 U *EcoRI*-et tartalmazó reakcióelegyben 20, 60, illetve 100 percig inkubált plazmid. (e) 5 µg/ml EtBr jelenlétében 4 U *EcoRI* enzimmal az emésztőelegyben 6 óráig inkubált plazmid. (f) *EcoRI* enzimmal a teljes emésztésig inkubált plazmid. M: lineáris kettős szálú molekulásúly-marker-DNS-ek. c.c.: supercoiled cirkuláris plazmid. 1L: a linearizált pACO289 monomer-fragmentum. 2L: a linearizált pACO239 monomerméret kétszeresének megfelelő mobilitású DNS.

Ismert, hogy a lineáris DNS fragmentumok mobilitására - a szuperhelikális konformációjú, cirkuláris formáktól eltérően - nincs jelentős hatása az ethidium-bromid koncentráció változásának (pl. Sambrook és mtsai, 1989). Ugyanazon emésztési elegyből vett mintákat különböző ethidium-bromid koncentrációjú gélekben futtatva a "2L" DNS mobilitása nem változott a molekulásúly marker-fragmentumokhoz viszonyítva (16. ábra), tehát nagy valószínűséggel lineáris DNS. A mutánsokból izolált emésztetlen plazmidok mobilitása viszont nagymértékben változott az EtBr-koncentráció függvényében. Ezen adatok alapján feltételezhető, hogy a mutánsokból izolált plazmidok megváltozott elektroforetikus mobilitását az okozza, hogy cirkuláris, egyetlen gyűrűt alkotó multimer (elsősorban dimer) formákban vannak jelen.



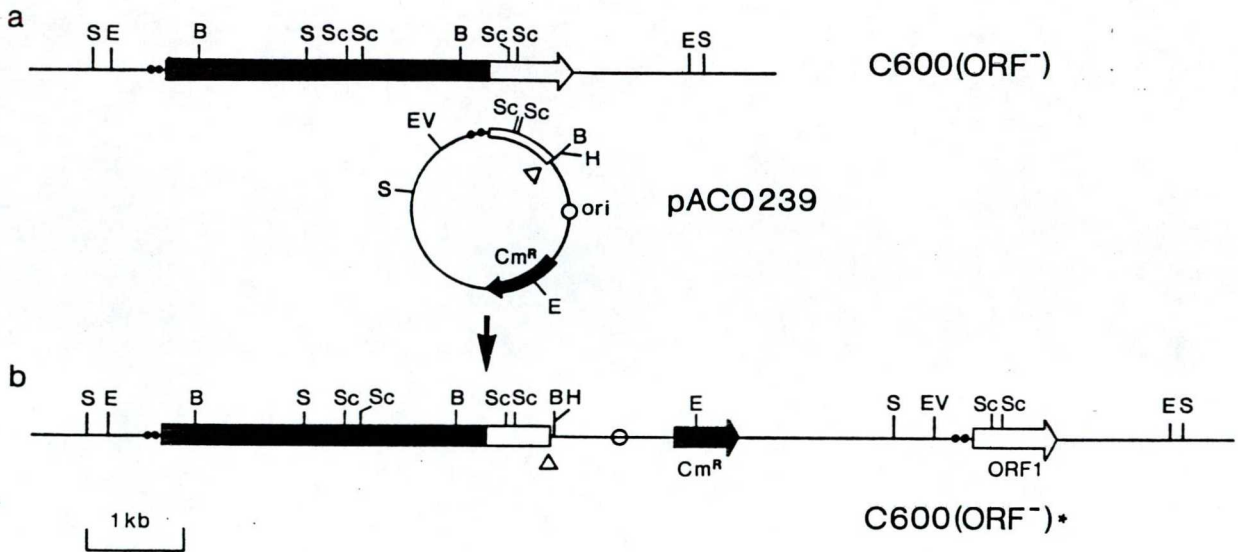
16. ábra. A C600 és C600(ORF⁻)* sejtekből izolált pACO239 plazmidok mobilitása különböző koncentrációjú ethidium-bromidot tartalmazó 1%-os agaróz gélekben. (1) C600 sejtekből izolált plazmid. (2) C600(ORF⁻)* sejtekből izolált plazmid. (a) emésztetlen, szuperhelikális plazmid. (b) *EcoRI*-gyel részlegesen emésztett plazmid (15. ábra e minta). M: kettős szálú molekulásúly-marker fragmentumok. (A) EtBr nélküli gél. (B) 0,05 µg/ml EtBr-t tartalmazó gél. (C) 0,5 µg/ml EtBr-t tartalmazó gél. (Az A és B géleket az elektroforézis után, fotózás előtt 0,5 µg/ml EtBr oldatban festettem.)

A mutánsokból izolált össz-DNS-t Southern-hibridizációs technikával vizsgáltam, hogy megállapítsam, történt-e a kromoszómán az elrontott ORF1 gén környezetében restrikciós analízissel kimutatható átrendeződés. A [C600(ORF⁻)** pBA0239] klónokból hatot, a [C600(ORF⁻)* pAC0239] klónokból hetet vizsgáltam meg. Az autoradiogramok értékelését nehezítette, hogy a preparátumokban az ORF-próbával hibridizáló plazmidok nagy mennyiségben voltak jelen, és a kromoszomális hibridizáló fragmentumok számára optimális expozíciós idő alatt kiterjedt feketedést okoztak az autoradiogramon. A különböző restrikciós enzimekkel emésztett minták autoradiogramjainak összehasonlítása azonban egyértelműen értékelhetővé tette azokat. *EcoRI*, *SacII*, *EcoRI-SacII*, *EcoRI-BglIII* és *SalI* emésztéseket alkalmaztam. Kétféle próbával hibridizáltam a filtereket mindegyik restrikciós emésztés esetében : az egyik az ORF1-et tartalmazta, a másik az ORF1 elrontására is használt 3,3 kb Tn5-fragmentum volt.

Az azonos plazmidot tartalmazó klónok hibridizációs képe nem különbözött egymástól egyik restrikciós enzim alkalmazása esetén sem, a két klóncsoport azonban különböző volt.

Az eredeti C600(ORF⁻) klón ORF1 környéki régiója és a plazmidok restrikciós térképeinek ismeretében valamennyi hibridizációs adattal összhangban álló struktúra a kromoszóma-plazmid-kointegrátum mindegyik vizsgált klónban. A 17. ábrán látható a kromoszómák ORF1 környéki

részének vázlatos szerkezete a pACO239 plazmid integrációja előtt és után, a Southern analízis során használt enzimek hasítóhelyeinek megjelölésével.



17. ábra. A plazmid-kromoszóma kointegrátumok szerkezete a Southern-analízisben alkalmazott restriktációs enzimek hasítóhelyeinek feltüntetésével. (a) A pACO239 és a C600(ORF⁻) kromoszóma a rekombináció előtt. (b) A kromoszóma a plazmid-integráció után. B *Bgl*III, E *Eco*RI, H *Hind*III, S *Sal*I, Sc *Sac*II. A háromszög az ORF1 végének delécióját jelöli.

A homológ rekombináció eredményeként a sejtben helyreállt az ORF1 gén épsége, azonban a kromoszómán a natív állapottól eltérő helyen. E struktúra alapján érthetővé válik a mutánsok életképessége, a normálistól eltérő fenotípus okának feltárása azonban további kísérleteket igényel.

V.3. A P31 protein túltermelésének fenotipikus hatásai

Az expressziós vektorokba klónozott ORF1 gén expressziójának indukciója után a növekedési ráta csökken. Ezt azonban expressziós vektorokba klónozott más gének esetében is tapasztaltam, valószínűleg a vektorról folyó intenzív transzkripció és transzláció aspecifikus hatása az alkalmazott tenyésztési feltételek esetén.

Az igen nagy mennyiségű P31 proteint tartalmazó sejtek poliakrilamid-gélelektroforézis után látható fehérjemintázata jellegzetesen eltér az azonos növekedési fázisban levő vad típusú sejtektől. A jelenséget különböző törzsekben (C600, HB101, JM107) is észleltem. (Az ORF1-expresszázó plazmidokkal transzformált HB101 sejtek fehérjéinek SDS-PAGE-képe a 4. ábrán látható).

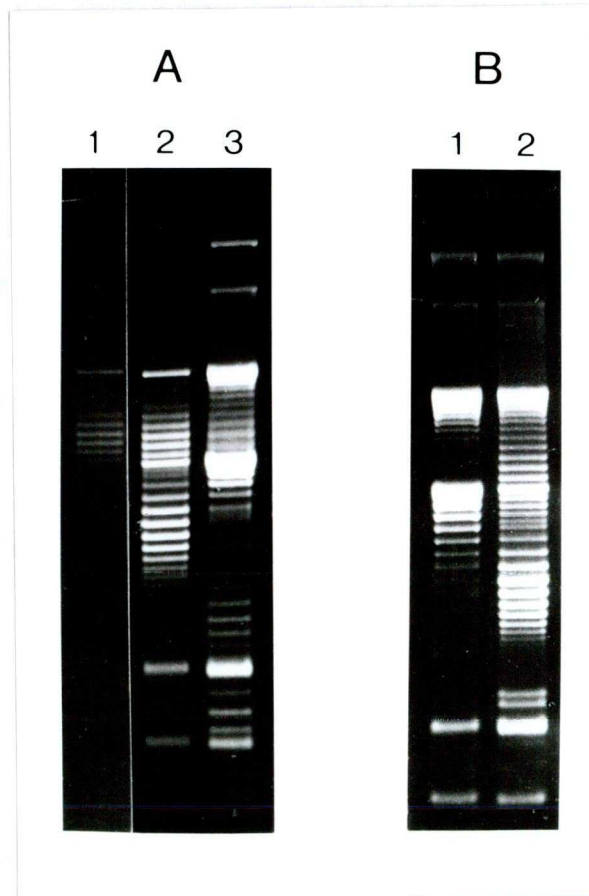
A fehérjemintázat kisebb mértékű megváltozása egyéb proteinek túltermeltetésekor is alkalmanként megfigyelhető, tehát lehet - legalábbis részben - a transzlációs apparátus túlterheléséből adódó aspecifikus hatás. A P31 túltermelésekor azonban a változások - más fehérjék túltermelésétől eltérően - reprodukálhatóak, és egyes, nem azonosított fehérjék mennyiségének változását csak a P31 túltermelő sejtek esetében tudtam kimutatni, humán proinzulin, kloramfenikol-acetiltranszferáz vagy b-galaktozidáz a-peptid túltermelése esetén nem.

A P31-túltermelő C600 sejtek a vad típusnál hosszabbak mind exponenciális, mind stacioner fázisban, a nukleoidok

a mutánsokhoz hasonlóan szegregálatlannak látszanak DAPI-festés után UV fényel megvilágítva (nincs ábra).

E szegregációzavar oka lehet a replikálódott kromoszómák topológiai szétválasztásának tökéletlensége (részletesebben lásd a VI. fejezetben) a dekaténációban szerepet játszó giráz enzim csökkent aktivitása miatt. A giráz aktivitását tükrözi a sejtekben lévő plazmidok szuperhelicitásának mértéke is (Pruss, 1985), ezért megvizsgáltam az indukált, illetve nem indukált sejtekből izolált plazmidok topológiai állapotát. A topoizomerek szétválasztására az egyik általánosan használt módszer a klorokvin jelenlétében végzett agaróz-gélelektroforézis. Az indukált illetve nem indukált C600 sejtekből izolált pVH1 és pERCHORF plazmidokat $13 \mu\text{gml}^{-1}$ klorokvint tartalmazó gélben futtattam. A klorokvin-eltávolítás és ethidium-bromidos festés után látszik, hogy a kisebb szuperhelicitású topoizomerek mennyiségének aránya megnő a túltermelő sejtéből származó pVH1 és pERCHORF plazmidpopulációban (18.A ábra). A leoltáskor indukált mintákban a plazmidmolekulák többsége teljesen relaxált állapotú (18.A ábra, 3). Annak bizonyítására, hogy ez nem az egyik DNS-szálon lévő nick-ek következménye, a plazmidokat nagyobb ($60 \mu\text{g ml}^{-1}$) klorokvin-koncentrációt tartalmazó agaróz gélben is elektroforetizáltam; e koncentrációnál a nagyobb pozitív szuperhelicitású topoizomerek gyorsabban vándorolnak. Látható (18.B ábra), hogy az indukált mintából izolált plazmidmolekulák többségének mobilitása

ekkor nagyobbá vált az indukálatlan sejtéből származó plazmidokénál. A relaxált plazmidok pozitív szuperhelikális konformációjúvá alakulása nem történhetett volna meg, ha azok nick-et tartalmaznak.



18. ábra. A P31 túltermelés hatása a C600 sejtben levő plazmidok szuperhelicitására. pERCHORF és pVH1 plazmidokkal kotranszformált sejtekből izolált plazmidok elektroforézise 1%-os agaróz gélben, klorokvin jelenlétében. (A) 13 $\mu\text{g/ml}$ klorokvint tartalmazó gél. (A1) pVH1-gyel transzformált sejtekből izolált plazmid. (A 2, 3; B 1, 2) C600 pVH1 pERCHORF sejtekből izolált plazmidok. (A2, B1) nem indukált, (A3, B2) indukált sejtekből izolált plazmidok. A P31 túltermelés indukciója 3 mM IPTG-vel történt a leoltás időpontjában. A plazmidokat $\text{OD}_{550}=2$ sűrűségű kultúra sejtjeiből preparáltam. (12 $\mu\text{g/ml}$ klorokvin-koncentrációnál a gyorsan vándorló topoizomerek negatív, 60 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációnál pozitív szuperhelicitásúak. Az elektroforézis iránya: az ábra felső részétől az alsó felé.)

VI. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

A P31 protein túltermeltetése, izolálása, anti P31 ellenanyag előállítása

Az igen gyengén expresszázó ORF1 gén fehérjetermékét sikerült nagy mennyiségben termeltetni *E. coliban* expressziós vektorok segítségével. A nagymértékű expressziónövelés eléréséhez az intenzív transzkripciót biztosító promoterek mellett szükségesnek bizonyult a Shine-Dalgarno-szekvencia hatékonyabbra cserélése. A pER235ORF, a pERCHORF és a pKKORF expressziójának összehasonlításakor kiderül, hogy a *lac* riboszómakötő hely közreműködésével induló transzláció (a pKKORF és valószínűleg a pERCHORF plazmidon is) hatékonyabb, mint az ORF saját riboszómakötő helyéről induló, még akkor is, ha transzlációs kapcsoltság áll fenn a megelőző β -galaktozidáz α -peptidjével (pER235ORF).

A túltermelő konstrukciók expressziója - különösen a pKKORF és pERCHORF plazmidoké - azt mutatja, hogy a gyengén expresszázó génekre jellemző kodon-használat nem limitálja a génről a sejtben transzlálódó fehérje mennyiségét, bár a kodon-használat a transzlációs rátát befolyásolja (Varenne és mtsai, 1984), és a génműködés egyik meghatározó tényezőjének tartják (Gouy és Gautier, 1982; Konigsberg és Godson, 1983).


A túltermelő törzsből a tisztítás idején még ismeretlen funkciójú proteint homogenitásig tisztítottam.

Az izolált P31 N-terminális szekvenciájának meghatározásával igazolódott, hogy az ORF1 transzlációja az open reading frame első kodonjánál (ATG) kezdődik, nem a következő ATG tripletnél, amely az ORF ötödik kodonja.

A P31 izolálása után lehetővé vált anti-P31 poliklonális antiszérum előállítása, amelyről immunprecipitációs vizsgálatokkal kimutattam, hogy nagy specificitással reagál a P31 proteinnel. A IV.2.16. fejezetben leírt immunprecipitációs módszer az affinitás értékelésére nem a legmegfelelőbb. Az antiszérum azonban feltételesen alkalmas érzékeny immunoblotting technikával végzendő kísérletekre, amelyekben a kromoszómáról különböző fiziológiai körülmények között szintetizálódó P31 mennyiségét szeretném összehasonlítani.

Az ORF1 elrontása a kromoszómán és esszencialitásának bizonyítása új módszer segítségével

Az ORF1 gén esszenciális voltát valószínűsítő rekombinációs gnehelyettesítési kísérletek után sikeresen alkalmaztam egy általam kidolgozott rekombinációs technikát feltételesen letális ORF1 mutáns létrehozására és egyben a gén esszencialitásának bizonyítására. A módszer előnye, hogy lehetővé teszi a rekombinánsok pozitív szelekcióját és ez a szelekció egyben a sejtben lévő plazmidok eliminációját is eredményezi. Bármely rec proficiens törzsben alkalmazható, és csak egyetlen plazmid szükséges hozzá, amely hőérzékeny replikációjú és



a rekombinációval helyettesíteni kívánt allélt hordozza. Amikor kitaláltam és alkalmaztam a módszert, még nem volt ismert a szakirodalomban. Az ORF1 gén sikeres elrontását azonban csak akkor publikáltuk (Balikó és Venetianer, 1993), amikor az ORF1 fehérjetermékének funkciója ismertté vált. Sajnos, időközben egy másik kutatócsoport már közölte az általam is alkalmazott elven alapuló génhelyettesítési módszert (Hamilton és mtsai, 1989). Ők szintén a pSC101 plazmid egy hőszenszítív származékát használták; létrehozták a *bolA* gén inszerciós-deléciós mutánsait, az *rnc* gént egy *in vitro* mutagenézissel előállított alléljével helyettesítették, és az *uvrD* kromoszomális deléciós-inszerciós mutánsának plazmidra mentését is elvégezték ezzel a módszerrel. Általános használhatóságát bizonyítja, hogy számos esetben választották különböző kutatócsoportok a Hamilton és munkatársai által közölt eljárást gének elrontása és feltételelesen letális mutánsok létrehozására.

Hamilton és munkatársai szerint a kointegránsok igen instabilak, a permisszív hőmérsékleten lassan szaporodnak és nagy gyakorisággal játszódik le a plazmid kiválása a kromoszómából. Ezt az instabilitást az ORF1 génnel végzett kísérletek során nem tapasztaltam.

A pHSG422 plazmid elvesztését magas hőmérsékleten a Hashimoto-Gotoh és mtsai (1981) által leírtnál lassúbbnak találtam. Elképzelhető - bár nem vizsgáltam -, hogy az



általam használt pHSG422 plazmidon a hőérzékenységet kismértékben csökkentő mutáció történt.

Sikerült bizonyítanom az ORF1 gén esszenciális voltát: kimutattam, hogy az ORF⁻ kromoszómájú rekombinánsok életképessége a plazmidon expresszálandó ORF1 jelenlététől függ.

Az P31 megváltozott mennyisége okozta fenotipikus hatások

A feltételesen letális mutáns létrehozása az ismeretlen funkciójú gén esszencialitásának bizonyítása mellett lehetőséget teremtett a géntermék csökkent mennyisége okozta fenotipikus hatások vizsgálatára is. 42 °C-on a táptalajra szélesztett mutáns sejtekből nem képződik látható telep. A sejtek azonban néhány osztódásra képesek a plazmid replikáció számára permisszívnél magasabb hőmérsékleten, miközben a plazmid fokozatosan eliminálódik a sejtekből. Eközben a fenotipikus változások könnyen megfigyelhetők folyadék kultúrában 42 °C-on vagy táptalajon 37 °C-on: a telepek és a sejtek alakja eltérő a vad típusú sejtektől. A megnyúlt, szinte egész hosszukban szegregálatlan nukleoidokat tartalmazó sejtek a sejtosztódás és a replikálódott kromoszómák szétválásának zavarát jelzik.

Ismert, hogy ha a replikáció során a termináció és a leánykromoszómák szétkapcsolódása nem megy végbe, a sejtosztódás gátlódik és fonalas sejtek képződnek. Az ORF⁻

mutat

mutánsok fenotípusa hasonló a *gyrA* (Hussain és mtsai, 1987) és a *gyrB* (Orr és mtsai, 1979) mutánsok fenotípusához. A topoizomeráz II (giráz), amelynek alegységeit a *gyrA* illetve a *gyrB* gén kódolja, és a topoizomeráz IV *in vivo* résztvesznek a replikálódott kromoszómák topológiai szétválasztásában (Steck and Drlica, 1984; Kato és mtsai, 1990).

Az a folyamat, amely biztosítja, hogy az osztódó utódsejtekbe egy-egy replikálódott kromoszóma kerüljön, két szakaszra osztható: 1. (a) a replikálódott, a replikációs terminusnál egymásba kulcsolódott kromoszómák szétválasztása topoizomerázok segítségével. (b) az esetleg képződött cirkuláris dimerek monomerizációja a XerC-XerD rekombinázorok részvételével a terminus régióban lévő *dif* helyen (a dimerek akkor jönnek létre, ha a homológ kromoszómák között páratlan számú rekombinációs esemény történt a replikáció közben). 2. Az elkülönült, nukleoidstruktúrába szerveződött kromoszómák eltávolodása a sejthossz 1/4-e és 3/4-e pozíciójába.

Az egyes szerzők szóhasználata a két lépés megjelölésére eltérő. A dolgozatban következetesen az 1. lépés eseményeit jelölöm a "szegregáció" szóval Steck és Drlica (1984) nyomán. A 2. szakasról (partíció, szeparáció) a továbbiakban nem esik szó, mivel a partíciós mutánsok fenotípusa az ORF^- mutánsokétól megkülönböztethető: a sejtosztódás nem gátlódik, kromoszóma nélküli és két (DAPI-festés után mikroszkóppal láthatóan) elkülönült

nukleoidot tartalmazó sejtek képződnek a normális osztódási termékek mellett (Hiraga és mtsai, 1989). (A szegregáció, nukleoid-szerveződés és partíció eseményeinek áttekintését lásd például Hiraga (1993) és Lobner-Olesen és Kuempel (1992) összefoglalójában.)

A P31 protein túltermelése is az ORF⁻ mutánsokéhoz hasonló megnyúlt sejtalakot és tökéletlen szegregációt eredményez, és a sejtekben lévő plazmidok szuperhelikális tenziójának csökkenéséhez vezet (V.3. fejezet). A szuperhelicitás változása nem a transzkripció-indukció következménye, mivel az indukálható promotert nem tartalmazó pVH1 plazmidon is megfigyelhető. A giráz enzimnek a kromoszóma-szegregációban játszott szerepén kívül szuperhelix struktúrát előidéző aktivitása is van (Gellert és mtsai, 1976), míg a topoizomeráz I a szuperhelicitás csökkentésére képes. A plazmidok szuperhelikális állapota tükrözi a giráz és a topoizomeráz I aktivitását a sejtben, amelyből a plazmidokat izolálták (Pruss, 1985). A túltermelő sejtekből izolált plazmidok csökkent negatív szuperhelicitása tehát szintén a giráz-topoizomeráz I aktivitás-arány csökkenésére utal.

Az ORF⁻ mutánsok és a túltermelő sejtek fenotípusa hasonlóságokat mutat a sejtosztódáskor a szeptum normális lokalizációjához szükséges *min* lokusz egyes mutánsaihoz. Kimutatták, hogy a *minB* mutánsokban a nukleoid-szegregáció tökéletlen (Jaffé és mtsai, 1988, Mulder és mtsai, 1990). A mutánsokból izolált plazmidok csökkent

szuperhelicitásúak, és a *minB* géntermékek túltermelése szintén zavart nukleoid szegregációt és csökkent plazmid szuperhelicitást eredményez (Mulder és mtsai, 1990). Mulder és munkatársai feltételezése szerint a tökéletlen nukleoid szegregáció okozhatja az abnormális osztódási termékek (sejtfonalak és kromoszóma nélküli minisejtek) megjelenését a *min* és a *gyr* mutánsokban. Az ORF⁻ mutánsok és P31 túltermelő sejtek eddigi kísérletekben feltárt fenotípusa legvalószínűbb magyarázatának az látszott, hogy ezekben ismeretlen okból csökkent a giráz/topoizomeráz I aktivitás-arány, ami a leánykromoszóma-szegregáció tökéletlenségét okozza. A fonalas sejtek a szegregációzavar okozta sejtosztódás-gátlás következménye lenne, a *gyr* és esetleg a *min* mutánsokhoz hasonlóan.

A fenotípus értelmezését bonyolultabbá teszi, hogy hosszabb idő után a mutánsok mikroszkópos képe megváltozik (V.2.2.4. fejezet): a szegregált nukleoidokat tartalmazó, a többiekénél duzzadtabbnak tűnő sejtek és lizált sejtek maradványainak megjelenése, továbbá a 37 °C-on nőtt egyes telepek áttetszősége felvetette valamilyen sejtfal-eltérés lehetőségét is.

Mégis meglepő volt, amikor a dolgozatban leírt kísérletek befejezése után Mengin-Lecreulx kutatócsoportja publikálta, hogy megtalálták a sejtfal-alkotórész D-glutaminsavat szintetizáló enzim génjét, amely az ORF1 génnel azonos (Doublet és mtsai, 1992). E tény irányt szab az ORF⁻ feltételes mutánsok

fenotípusának "megfejtésére" irányuló próbálkozásoknak, de nem kínál triviális magyarázatot.

Az *E. coli* sejtfal összetétele régóta ismert. A murein polimert alkotó muropeptid egységek citoplazmában történő szintézisének és a sejtfalba épülésüknek útját nagyrészt feltárták, az e folyamatokban szerepet játszó enzimek egy részének génjét azonosították (a sejtfalszintézisről szóló legfontosabb információkat a Függelékben foglalom össze). Az enzimek közül azonban csak keveset izoláltak és jellemeztek biokémiai módszerekkel.

E. coliban csak egyetlen D-glutamát auxotróf mutánst találtak: az *E. coli* B-ből izolált WM335 törzset (Hofmann, 1972). A WM335 sejtek D-glu megvonás után egy-két generáción belül lizálnak. Kimutatták, hogy az UDP-MurNac-L-Ala prekursor akkumulálódik a sejtben, de az enzimdefektus azonosítása nem sikerült. Az UDP-MurNac-L-Ala: D-Glu ligáz nem érinti a WM335 mutációja, amelyet a 73 és 98 perc közötti kromoszómaszakaszra térképeztek (Lugtenberg és mtsai, 1973). A citoplazmatikus murein-komponens szintetizáló enzimeket kódoló gének nagy része a 2 percnél elhelyezkedő régióban található, azonban a 90 perc környékén egy másik *mur*-géncsoportot feltételeztek (*mrb*). E régióba térképezték a *murA* és a *murB* géneket. 1992-ben azonosították a *murB* gént az *rrnB* 3' végével szomszédos ORF II-vel (Doublet és mtsai, 1992, Pucci és mtsai, 1992). Ezután a közeli, nagyrészt ismert szekvenciájú és csak néhány azonosítatlan ORF-et

tartalmazó kromoszómaszakaszon keresték a *murB* és a D-Glu prototrófiáért felelős géneket.

Doublet és mtsai (1992) kísérleteiben az *E. coli* fág- illetve plazmid-klóntárból származó ORF1 komplementálta a WM335 mutáns fenotípust, így egyértelműen azonosítható volt a D-Glu szintéziséért felelős enzim génjével, amit *murI*-nek neveztek el. Az ORF1 azonosítását nem sokkal később Pucci kutatócsoportja is publikálta (Dougherty és mtsai, 1993), ők *dga*-nak nevezték el a gént (D-glutamic acid). Megállapították azt is, hogy a WM335 két génben tartalmaz mutációt: az ORF1 240. kodonja amber, ezenkívül a glutamát permeáz *gltS* génjében két missense mutáció található, amely az egyébként kis hatékonyságú glutamát felvétel fokozódását eredményezi. Ez megmagyarázza, miért nem sikerült több D-glu auxotróf mutánst izolálni: a vad típusú glutamát transzport-rendszer tökéletlensége miatt a *murI* mutánsok akkor sem életképesek, ha a médium D-glutamátot tartalmaz (ez a megállapítás csak gazdag médiumra vonatkozik, lásd később).

A C600(ORF⁻) mutánsokkal végzett csonka génes plazmid-csere kísérletekből levont következtetés összhangban van Dougherty és mtsai eredményével: a C-terminális 50 aminosavat nem tartalmazó csonka P31 protein nem funkcióképes.

Nem sokkal az V. fejezetben is leírt kísérletekről szóló közlemény megjelenése előtt (Balikó és Venetiáner, 1993) Doublet és munkatársai is publikálták, hogy az ORF1=*murI* gén esszenciális (Doublet és mtsai, 1993), és

megállapították, hogy a gén terméke glutamát racemáz. A feltételesen letális mutánst a Hamilton és mtsai által közölt módszerrel hozták létre. A *murI* gént hőérzékeny plazmidon hordozó *murI*⁻ kromoszómájú sejtek folyadék-kultúrában 42 °C-on növesztve néhány óra után lizálnak.

Az ORF1(*murI*) génre vonatkozó új ismeretek birtokában megvizsgáltam a D-glutaminsav hatását mutánsaim fenotípusára. YTB tápfolyadékhoz adott D-glutaminsavval nem tudtam komplementálni a mutánsokat. A komplementáció sikeres volt azonban, ha a C600(ORF⁻) pHCO289 sejteket a *gltS* gént expresszáló pMK15 plazmiddal (Kálmán és mtsai, 1991) transzformáltam. A transzformánsok 42 °C-on telepet képeztek, a pHCO289 plazmid eliminálása után is normális növekedési rátával nőttek 100 µg/ml D-Glu jelenlétében, annak megvonása után azonban percekben belül lizáltak. Minimál tápfolyadékban a D-glutaminsav felvétele hatékonyabb (Doublet és mtsai, 1993). Sikerült is M63 táptalajon 100 µg/ml D-glu jelenléte esetén az ORF⁻ fenotípust komplementálni 42 °C-on és a hőérzékeny plazmidot nem tartalmazó sejteket izolálni. E C600(ORF⁻) sejtek M63 tápfolyadékban tenyésztve a D-glu megvonást követően körülbelül egy óra múlva lizáltak.

A lízis fenotípus a feltételesen letális sejtfal-szintézis mutánsokra jellemző (pl. Mengin-Lecreulx és van Heijenoort, 1991). A pHA0289 vagy pHCO289 plazmidot hordozó C600(ORF⁻) mutánsok az V.2 fejezetben leírt kísérleteim során megfigyelt fenotípusa azonban ettől

különböző, bár hosszabb inkubáció után a lízis is megfigyelhető. Ismereteim szerint még senki nem közölt nukleoid szegregációs zavart sejtfalszintézis-mutánsokban. A WM335 törzs sem mutatja ezt a jelenséget. Ennek az lehet az oka, hogy a sejtfalszintézis zavara okozta lízis a D-glu megvonás után gyorsan, egy-két generáción belül megtörténik, míg a C600(ORF⁻) mutánsokban az általam alkalmazott tenyésztési körülmények között a P31 protein kihígulása és következményeként a D-glutaminsav-pool kimerülése sokkal lassúbb, így a szegregációs defektus detektálható a lízis megtörténte előtt.

Felmerül a kérdés, hogyan vezethet egy sejtfalalkotórészt szintetizáló enzim aktivitásának megváltozása a kromoszómaszegregáció zavarához. A kérdés véleményem szerint azért különösen érdekes, mert eddig kevéssé ismert jelenségek felé irányíthatja a figyelmet, amelyeknek esetleg szerepe lehet a baktérium-sejtciklus folyamatainak összehangolásában.

Az *E. coli* sejtciklus során a kromoszóma-replikáció, szegregáció és partíció a szeptumképződéssel térben és időben szigorúan koordináltan zajlik le. Számos megfigyelés bizonyítja, hogy vad típusú sejtek osztódása során a szeptum pontosan a sejt közepén képződik, és a leánysejtek azonos számú kromoszómát és replikációs origót tartalmaznak. Kromoszóma nélküli utódsejtek csak igen kis gyakorisággal keletkeznek. E koordináció mechanizmusa azonban még ismeretlen, bár a sejtciklus

egyreszfolyamatai többé-kevésbé jól ismertek (a sejt-ciklusra vonatkozó ismereteket összefoglaló művek pl. de Boer és mtsai, 1990; Donachie, 1993; Lutkenhaus, 1993).

Régóta ismert, hogy a DNS-szintézis és a kromoszómaszegregáció zavarai gátló hatással vannak a sejtosztódásra. A DNS sérülése (pl. UV sugárzás hatására) kiváltja az SOS választ, amelynek során DNS repair enzimek szintézise indukálódik (Huisman és D'Ari, 1981). A sejtosztódás gátlása is része az SOS válasznak, fonalas, sok kromoszómát tartalmazó sejtek képződnek. E gátlást a *sfiA* gén indukciója váltja ki, amelynek fehérjeterméke az FtsZ proteinnel kölcsönhatásba lépve gátolja annak sejtosztódást megindító aktivitását.

A DNS-szintézis vagy szegregáció zavarai azonban olyan körülmények között is gátolják a sejtosztódást, amikor az SOS-rendszer nem indukálódik, vagy SOS-válaszra képtelen *recA* vagy *lexA* mutánsokban is (Jaffé és mtsai, 1986).

A szegregálatlan kromoszómák sejtosztódást gátló hatását bizonyító kísérleteken (pl. Mulder és Woldringh 1989, 1991) alapul a nukleoid-kizárásos modell a két folyamat tér- és időbeli összehangoltságának magyarázatára (Woldringh és mtsai, 1990, Woldringh és mtsai, 1991). A modell szerint a nukleoidok körül zajló transzkripció-transzláció során rövid távon ható, szeptumképződést gátló, a replikáció terminációjakor azonban aktiváló szignál képződik. A szegregáció során a kétféle szignál térbeli eloszlása olyan lesz, hogy a szeptumképződés iniciációja

a szegregált nukleoidoktól bizonyos távolságban, normális esetben a nukleoidok közötti területen válik lehetővé.

Másik elmélet szerint viszont a sejtfalképződés helyei előre kijelölt periplazma-kompartmentumok (Cook és mtsai, 1987), azonban ezen elmélet kísérleti alapjait mások cáfolják (Mulder és Woldringh, 1993).

Míg számos megfigyelés bizonyítja a DNS-szegregáció elmaradásának gátló hatását a sejtosztódásra, a fordított irányú információáramlásról jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk: azaz nem tudjuk, hogy a szeptumképződés zavarának van-e hatása a szegregációra.

A legutóbbi időkhöz a kísérletek inkább e hatás hiányára utaltak: 1968 óta számos, a szeptum-szintézisben szerepet játszó gén hőérzékeny mutánsait fedezték fel. E mutáns-osztály (*fts*: filamentation temperature sensitive) jellemző fenotípusa a filamentáció a nonpermisszív hőmérsékleten, a kromoszóma-szegregáció zavara nélkül (Hirota és mtsai, 1968). Az *Fts* proteinek többségének biokémiai funkciója nem ismert, csak a szeptumképződésben történő részvételük időbeli sorrendje, és számos kísérlet eredménye utal egyes *Fts* proteinek *in vivo* kölcsönhatására.

Az egyik legtöbbet vizsgált *Fts* protein a sejtosztódás megindításában kulcsszerepet játszó *FtsZ*, amely az ismert *Fts* proteinek közül a sejtosztódás legkorábbi fázisában fejti ki hatását. A sejtciklus nagy részében diffúzan fordul elő a citoplazmában, az osztódás megkezdése előtt azonban polimerizálódik és egy gyűrűt alkot a sejtmembrán

közelében (Bi és Lutkenhaus, 1991). Feltételezik, hogy az FtsZ gyűrű jelöli ki az osztódás helyét és a szeptum növekedését koordinálja. Bi és Lutkenhaus (1992) eredményei megerősítik ezt a feltételezést, valószínűsítve, hogy az FtsZ-gyűrű kölcsönhatásba lép a szeptumszintézist végző proteinkomplexummal, és aktiválja a PBP3 enzimet.

Az FtsZ protein hiánya a mutánsok eredeti definíciójának megfelelően csak a szeptumképzésre van hatással, a szegregációra nem. Az FtsZ szint csökkenése a sejtben azonban a szeptációra és a szegregációra is gátló hatással van (Tétart és mtsai, 1992). A nukleoid-szegregáció az FtsZ szintézis felfüggesztése után időlegesen gátlódik, de helyreáll, amint az FtsZ tovább hígítódik a fonalassá vált sejtekben. Tétart és munkatársai feltételezik, hogy az FtsZ protein szerepet játszik a szegregáció szabályozásában, következésképpen a szegregáció és a sejtosztódás egymáshoz kapcsolásában. E szerep létezésére utalnak Ruberti és munkatársai (1991) eredményei is, akik az *ftsZ84* mutációt szuppresszálták bizonyos *gyr* mutánsokkal, amelyeknek a DNS topológiára gyakorolt hatása normális volt, és az *ftsZ* expressziójára sem voltak hatással. Feltételezik, hogy az FtsZ és a giráz között kölcsönhatás létezik.

A MinCD proteinekről kimutatták, hogy kölcsönhatásba lépnek az FtsZ proteinnel, és túltermelésük esetén a sejtben megakadályozzák az FtsZ gyűrű kialakulását (Bi és Lutkenhaus, 1990, 1993). A MinCD és MinE proteinek

meghatározott mennyiség-aránya szükséges ahhoz, hogy a sejtosztódás a sejt közepén végbemehessen, de a pólusoknál nem. Amint fentebb írtam, a *min* mutánsokban és MinCD túltermelőkből a nukleoid szegregáció zavarát is megfigyelték, de nem ismert, milyen mechanizmussal jön létre.

Vajon hogy jön létre az egyes *ftsZ* és *min* mutánsokéhoz hasonló fenotípus a csökkent MurI aktivitású sejtekben, ha feltételezem, hogy a sejtfalszintézis zavara eredményezi a nukleoid szegregáció gátlását? A fent vázolt ismeretekből kiindulva egy hipotézist javaslok a fenotípus magyarázatára: a D-glutaminsav-pool csökkenése következtében a különböző UDP-NACMur-peptid prekursorok aránya a szeptum-szintetizáló enzimek számára nem optimális, így a szeptumképződés nem indul meg. A sejtosztódást iniciáló FtsZ gyűrű (amelynek kialakulását kiváltó szignál ismeretlen), a citoplazma-membránban lokalizálódó Fts proteineket aktiválva a szeptum-szintézist indítaná meg, ha a szubsztrát-koncentráció ehhez elegendő lenne. A szeptumszintézist nem végző PBP3 proteinnel kapcsolatban lévő multimolekuláris komplexum konformációja vagy stabilitása megváltozna, ami hatással lenne az FtsZ-re, és az a szegregációt gátló állapotba kerülne, ami analóg az *ftsZ* csökkent expressziójakor észlelt állapottal. Így a sejtben a sejtfaltól a kromoszómák felé irányuló információáramlás révén a szeptumszintézisre való képesség és a kromoszóma-szegregáció kapcsoltsága valósulna meg.

Ez a hipotézis más sejtfalszintetizáló enzimekre vonatkozva is feltételezhető; érdekes lenne megvizsgálni, vajon más *mur* gének lassan csökkenő expressziója következtében kialakult sejtfal-prekurzor pool változások hasonló hatással vannak-e a nukleoid-szegregációra.

A hipotézis abból a kézenfekvő feltételezésből indul ki, hogy a *murI* géntermék szintézisének csökkenése a sejtfal-prekurzorok szintjének megváltozásán keresztül elsődlegesen a szeptumszintézisre hat, és a szegregáció-zavar ennek a következménye. A jól ismert jelenség, azaz a szegregációhiány elmaradása okozta szeptációgátlás egy aminosav-racemáz enzim szintéziszavarának következményeként valószínűtlenebbnek látszik, de nem zárható ki lehetősége. Vannak elméletek, amelyek szerint a DNS peptidoglikánhoz történő kötődése szükséges a leánykromoszómák szétválasztásához. Jacob és mtsai (1963) feltételezték először, hogy a replikálódott kromoszómák a sejtfalhoz kapcsolódnak, és a közöttük lévő peptidoglikán elongációja révén mozdulnak el a pólusok irányába. Később az elméletet cáfolták, mivel bizonyossá vált, hogy az új sejtfalalkotórészek inszerciója nem zonálisan, hanem diffúzan történik. Helmstetter és Leonard (1987) és Cavalier-Smith (1987) elméletei azonban más mechanizmusokon keresztül, de szintén DNS-peptidoglikán kapcsolódást feltételezve magyarázzák a kromoszómák szegregációját. Ha e kapcsolódásnak valóban szerepe van a szegregációban, akkor elképzelhető, hogy a megváltozott sejtfalösszetétel

esetén zavart szenved, a szegregáció tökéletlenségét okozva, ami a szeptumképzés gátlásához vezet.

A mutánsokon és a túltermelő sejteken megfigyelt valamennyi fenotipikus jellemzőt a topoizomerázok aktivitászavarának következményeként lehetne a legegyszerűbben magyarázni - ha nem lenne ismert, hogy az ORF1 glutamát racemáz enzimet kódol... Jelenlegi (V. fejezetben nem szereplő) kísérleteim eredménye szerint a C600(ORF⁻) mutáns fenotípusú sejtekben is csökkent mértékű a plazmidok szuperhelicitása, a túltermelőkéhez hasonlóan. A P31 (MurI) túltermelés fehérjemintázatra gyakorolt pleiotróp hatása is elképzelhető a nukleoidok vad típustól eltérő szuperhelicitásának egyes gének transzkripciójára gyakorolt hatása következményeként.

A mutánsokból, illetve a P31(MurI) túltermelő sejtekből izolált plazmidok szuperhelicitásának vizsgálata alapján igen valószínűnek látszik, hogy a glutamát racemáz normálisnál kisebb vagy nagyobb aktivitása közvetett módon a topoizomerázok aktivitásának megváltozásához vezet. A topoizomerázokra - pl. a glu-koncentráció megváltozásán keresztül - gyakorolt esetleges hatás mechanizmusára vonatkozó bármilyen feltételezést kísérleti adatok hiányában még megalapozatlannak érzek. Érdeemesnek vélem kísérletek tervezését annak eldöntésére, hogy az osztódás-gátlás a topoizomeráz-aktivitás-változás miatti tökéletlen nukleoid-szegregáció következménye, vagy fordítva, a

sejtfalszintézis- zavar okozza a szegregációgátlást a megváltozott sejtfal-nukleoid kölcsönhatás révén (a fentebb vázolt vagy egyéb mechanizmus szerint). További kérdés, van-e fiziológiai körülmények között regulációs szerepe az általam megfigyelt jelenségnek. Alaposabb analízise segítséget nyújthat a sejtosztódás és a nukleoid-szegregáció mechanizmusára és koordinációjára vonatkozó hipotézisek igazolásához vagy cáfolásához.

Megválaszolatlan az a kérdés is, hogy a *murI* gén csökkent vagy megnövekedett expressziója milyen módon eredményez hasonló fenotipikus sajátosságokat. Erre a *min* mutánsok és MinCD túltermelők esetében sincs még válasz.

Lehetséges-e, hogy a *murI* gén termékének a glutamát racemáz aktivitástól független funkciója is van? Ez ellen szól, hogy D-glutamáttal a felvételét lehetővé tevő feltételek esetén a lízis fenotípus komplementálható, és a mutáns sejteken nem észleltek morfológiai elváltozást (Hoffmann, 1972, Doublet és mtsai, 1992). Saját plazmid nélküli mutánsaim is normálisan növekednek D-glu jelenlétében, míg annak elvonása után kb. egy óra múlva lizálnak. Lehetséges azonban, hogy a szegregációs hatást csak a sejtciklushoz viszonyítva lassú sejten belüli D-glu szint csökkenés esetén lehet érzékelni, ahogy a hőérzékeny plazmidos, YTA táptalajon végzett kísérleteim során valószínűleg történt. Jelenleg kísérleteket végzek annak kimutatására, hogy a generációs idő többszöröse alatt létrejövő D-glu elvonás hatására megtörténik-e

valamennyi, az Eredmények fejezetben leírt fenotipikus változás. Másik elvégzendő kísérlet annak vizsgálata, hogy a *murI* expresszázó hőszenszitiv plazmidot tartalmazó C600(*murI*⁻) sejteket 37 vagy 42 °C-on tenyésztve a plazmid fokozatos kihígulása után megfigyelhető-e a szegregáció-gátlás és (vagy) a szuperhelicitás-csökkenés, ha a (minimál) médium D-glutaminsavat tartalmaz. Amennyiben a szegregációs zavar a *murI* gén működésétől függetlenül, a D-glu ellátottság változásával nem változhat ki, megfontolandó a *murI* gén egy nem esszenciális, de a szegregációban bizonyos körülmények között szerepet játszó második funkciójának feltételezése.

Az kizárható, hogy a szegregációs hatás másik génben bekövetkezett mutáció eredménye lenne, mivel a mutáns fenotípus az ORF1- expresszázó hőérzékeny plazmiddal 30 °C-on vagy hőstabil, nem nagymértékű túltermelést biztosító plazmiddal magasabb hőmérsékleten is komplementálható.

Megválaszolásra vár az a kérdés is, azonos-e a *murI* gén egy, a 89,5 perc környékére, a *btuB* gén közelébe térképezett génnel (*mbrC*). Az *mbrC* mutánsokat Trun és Gottesman (1990) kámfor-rezisztenciára történő szelekcióval, új típusú sejtciklus-mutánsok keresése során találta; sejt-és nukleoidmorfológiájuk az általam leírt mutánsokéhoz igen hasonló. Trun és Gottesman (1990, 1991) feltételezik, hogy a leánykromoszómák szétválasztásában vagy a partíció és az osztódási ciklus egymáshoz kapcsó-

lásában van szerepük. Nancy Trunnal együttműködve megpróbáljuk a két gén azonosságát bizonyítani vagy cáfolni.

Az *E. coli* kromoszóma 89,3-90 perces régiójának teljes nukleotidszekvenciája ismert; 1994 elején még két ismeretlen funkciójú fehérjét kódoló ORF található az ORF1 (*murI*, *dga*)-tól 4-5 kb távolságra (Blattner és mtsai, 1994 adatai alapján), és három, több-kevesebb pontossággal e szakaszra térképezett, azonosítatlan gén: *rer*, *mbrC*, *murA*. Így nagy esély van arra, hogy az *mbrC* már valamely funkcióhoz társított ORF-mel azonos.

Igen különös az ép ORF1-et a kromoszómán a vad típustól eltérő környezetben expresszááló törzsek viselkedése (V.2.2.6. fejezet): az észlelt fenotípus a C600(ORF⁻) mutánsok az ORF1-et hordozó plazmid eliminálása során megfigyelhető fenotípusára emlékeztet, bár a sejtmegnyúlás kisebb mértékű. Valószínűnek tartom, hogy a plazmid-kromoszóma kointegránsokban az ORF promoterrégiójában a DNS-konformáció a vad típustól eltérő, ami a génexpresszió változásához vezethet. (Amint az Irodalmi áttekintésben írtam, a P3 P4 transzkripciójára a promoterrégió topológiai állapota nagy hatással van). Ha a plazmid-kromoszóma-kointegránsok fenotípusáért az ORF1 megváltozott expressziója a felelős, a P3 P4 promoterek működését ezekben a sejtekben valószínűleg a DNS-konformáció lokális eltérése változtatta meg. Prokariótákra ez nem jellemző, bár a *Salmonella typhimurium* *leu-500* promoter-mutánsának esetében

valószínűnek tartják ilyen hatás létezését. (Richardson és mtsai, 1988). Az egyes promoterek szuperhelicitás-érzékenységének mértékét meghatározó tényezőkről még keveset tudunk: a P3 P4 vizsgálata hozzájárulhat megismerésükhöz. Érdekes kérdés az is, van-e *in vivo* regulációs szerepe ezen érzékenységnek (pl. *Salmonella typhimurium*-ban az extracelluláris ozmolalitás növekedése a kromoszóma szuperhelicitás-fokozódásának közvetítésével egy ozmotikus regulációban szerepet játszó gén, a *proU* expresszióját indukálja (Higgins, 1988).

A C600(ORF-)* és C600(ORF-)** klónok fenotípusára természetesen az V.2.2.6. fejezetben leírt kísérletek nem adnak magyarázatot. Azért tartottam érdekesnek tárgyalásukat a dolgozatban, mert a fent leírtak értelmében az ORF-expresszió különös vonásaira mutatnak rá, amelyeket szeretnék majd tovább analizálni.

A *murI* gén expressziójának tanulmányozása azért is érdekesnek ígérkezik, mert a sejtben valószínűleg szigorú szabályozás alatt áll; a sejt "igényeitől" eltérő mértékű expresszió súlyos zavarokat okoz a sejtciklus két folyamatában, a szeptumképződésben és a kromoszóma-szegregációban. A sejfalszintézisben részt vevő gének regulációjáról még igen keveset tudunk. Az eddigi ismeretek arra utalnak, hogy a sejt szigorú kontroll alatt tartja a sejtfal-prekurzorok anyagcseréjében résztvevő enzimek aktivitását és (vagy) szintézisét: elképzelhető, hogy e kontroll hiánya a sejtanyagcsere egyéb

folyamataira is hatással lenne. A különböző, sejtfal-szintézisben-bontásban részt vevő enzimek aktivitásának aránya a morfogenetikus folyamatokat és a sejtosztódás időzítését is befolyásolja (Begg és mtsai, 1990).

A *murI* génnel kapcsolatos, az értekezésben leírt kísérletek alapján felvetődött kérdésekkel szeretném hangsúlyozni, hogy a gén működésének további analízise több szempontból is hasznos lehet a prokarióta sejtműködés egyes, még kevésbé ismert mechanizmusainak megértésében. E kérdések egyben a további kísérletek irányait is kijelölik, amelyekhez a legfontosabb feltételek az értekezésben leírt munka eredményeként rendelkezésre állnak.

ÖSSZEFOGLALÁS

A dolgozatban az *E. coli* *rrnB* operon közvetlen közelségében elhelyezkedő, a munkám kezdetén még ismeretlen funkciójú génnel foglalkoztam, amelyről egy ideig feltételeztük, hogy a riboszomális RNS szintézisben játszik szerepet. A klónozott gént expressziós vektorokba építve a gén fehérjetermékének jelentős "túltermelését" értem el *E. coli* sejtekben. A proteint (P31) homogenitásig izoláltam, immunizálás után poliklonális anti-P31 specifitású ellenanyagokat nyertem kecskéből. A gén funkciójának feltárása érdekében inaktiváltam a gént a kromozómán egy új rekombinációs módszerrel, és megállapítottam, hogy esszenciális. A feltételesen letális mutánsok fenotípusa a nukleoid-szegregáció és a sejtosztódás zavarát mutatta. Hasonló jelenséget figyeltem meg a túltermelő sejteken is, amelyekben a plazmidok szuperhelicitásának csökkenése is kimutatható volt. Időközben más kutatócsoportok megállapították, hogy az ORF1 a sejtfalkomponens D-glutaminsav szintézisét végző glutamát racemáz enzim génjével (*murI*, *dga*) azonos. Az általam leírt fenotípust azonban sem a *murI*⁻ mutánsok, sem más sejtfalszintézis-mutánsok vizsgálata során nem észlelték. A dolgozatban megkíséreltem e látszólagos ellentmondás lehetséges okait felvetni és a jelenség további vizsgálatának esetleges jelentőségére rámutatni a sejtciklus egyes folyamatai koordinációjának megismerésében.

VIII. FÜGGELÉK

AZ *ESCHERICHIA COLI* SEJTFAL SZERKEZETE ÉS SZINTÉZISE

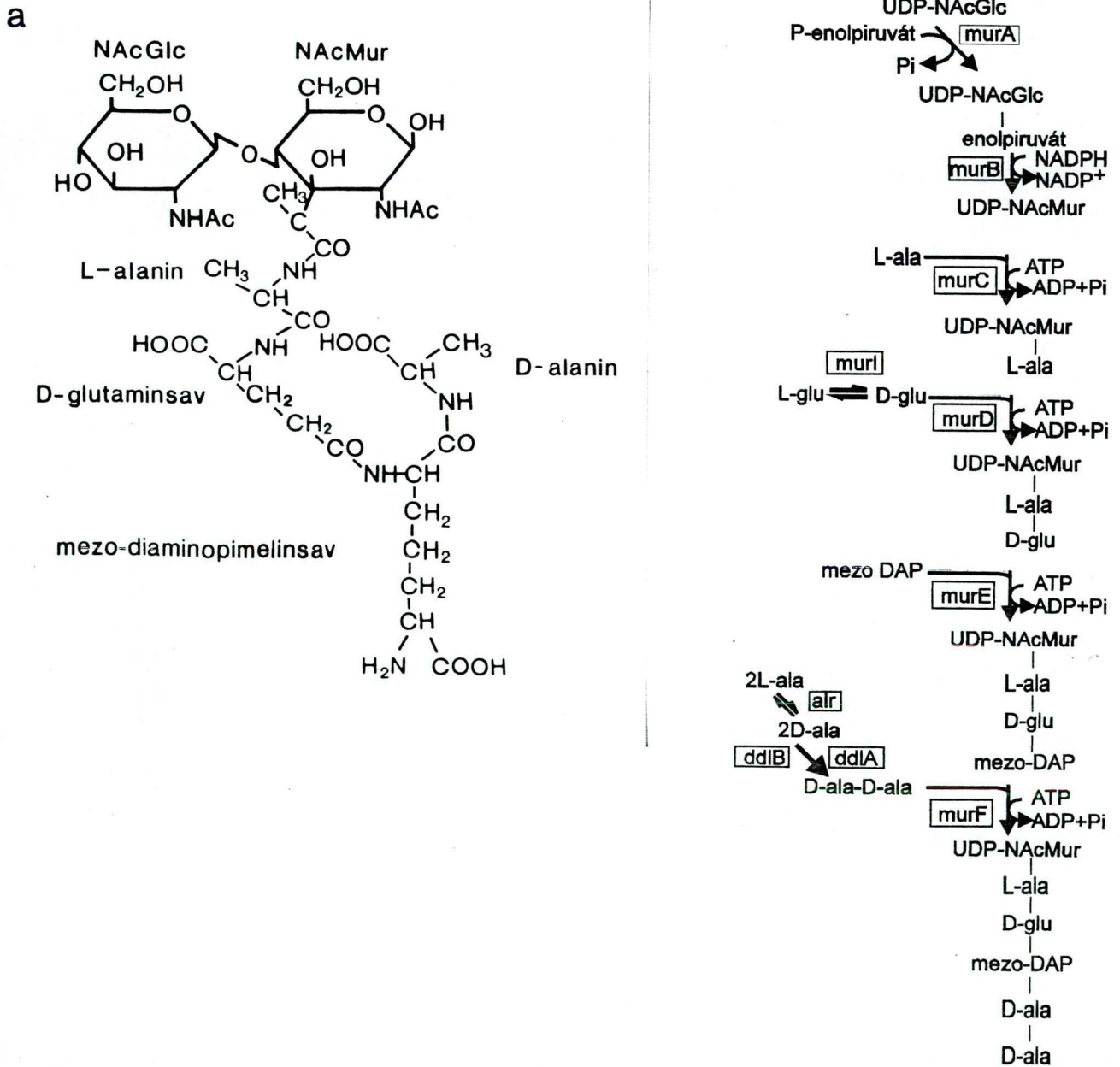
A teljes áttekintésre nem törekvő összefoglalót elsősorban Park (1986a, 1986b) és Cooper (1991) írásai alapján állítottam össze.

Az *E. coli* sejtek külső és belső membránja között, a periplazmatikus térben helyezkedik el a peptidoglikán (murein) réteg, amely a sejt alakját biztosítja és védelmet nyújt mechanikai és ozmotikus stresszek ellen. A sejtfa a peptidoglikán-láncokat összetartó kovalens kötések következtében egyetlen óriásmolekulának tekinthető. Az osztódási ciklus folyamán, a polimert alkotó újabb egységek inszerciójakor, meglévő kovalens kötések hidrolizálnak, de a "murein-zsák" integritása megmarad.

A sejtfa kémiai összetétele:

A peptidoglikán polimer ismétlődő egysége a muropeptid (21.a ábra), amelyet N-acetilglukózamin, N-acetilmuraminsav (N-acetilglukózamin D-tejsav-éterrel szubsztituálva a C-3 atomon), L-alanin, D-glutaminsav, mezo-diaminopimelinsav (DAP) és D-alanin alkot, közelítőleg ekvimoláris mennyiségben. A cukormolekulák 1-4 glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Mindegyik muraminsav karboxilcsoportjához amid-kötéssel egy L-alanil-D-isoglutamil-L-mezo-diaminopimelil-D-alanin peptid kapcsolódik. A peptidok egy részéről a sejtfaiban hiányzik a D-alanin, másik

részéhez még egy további D-alanin kapcsolódik. Az átlagos glikán-szál egyes mérések szerint körülbelül 30, mások szerint ennél kevesebb muropeptid (diszaharid-peptid-egység) hosszúságú. Minden 10. muropeptidhez egy molekula



21. ábra: (a) Az *E. coli* sejtfalat alkotó alapegység szerkezete. NAcGlc: N-acetilglukózamin, N-AcMur: N-acetilmuraminsav. (b) Az UDP-NAcGlc-NAcMur pentapeptid szintézisének lépései és az abban résztvevő enzimek génjei.

lipoprotein kapcsolódik. A szomszédos szálak keresztkötötték egymással a peptid-oldalláncon keresztül. A kötések többsége az egyik szálon lévő 4. pozíciójú D-alanin karboxilcsoportja és a másik szál DAP-jának ϵ -aminocsoportja között jön létre. A muropeptidek körülbelül a fele vesz részt keresztkötésben. A murein réteget monomolekuláris rétegnek tételezik fel. A glikán szálak egymással paralell helyzetben, a sejt hossz tengelyére merőlegesen helyezkednek el. A külső membránt a lipoprotein molekulák rögzítik a mureinhez. A külső membránban elhelyezkedő porin-fehérjék is erősen a mureinhez asszociálódnak. Egyes megfigyelések arra utalnak, hogy a membránok és a peptidoglikán közötti adhéziós zónák révén periplazmakompartmentumok alakulnak ki (Cook és mtsai, 1986).

A murein-bioszintézis szakaszai:

1. Nukleotid-aktivált UDP-N-acetilmuramil-pentapeptid és UDP-N-acetilglukózamin prekursorok szintézise. A prekursorok és a szintézist végző enzimek a citoplazmában találhatóak. A 21.b. ábrán látható a szintézis lépéseinek vázolata a résztvevő enzimek génjeinek feltüntetésével.

2. A murein ismétlődő egységeinek összeállítása baktoprenil-foszfáthoz kötve. A baktoprenil-származékok és a szintézisben résztvevő enzimek a citoplazma-membránhoz kötődnek.

3. Az ismétlődő egységek polimerizációja és a lineáris szálak keresztkötéseinek létrehozása transzpeptidációval. Az enzimek (penicillin-kötő proteinek, PBP-k) a citoplazmamembránhoz asszociáltan helyezkednek el, aktív helyük a

membrán külső felén van, a periplazmatikus térben működnek.

A sejtfal elongációja és a szeptáció a sejtciklus során elkülönült lépések. Az elongációban résztvevő enzimek: a PBP1a és a PBP1b a glikán szál polimerizációját és a keresztkötés képzést végzik, a D-D-karboxipeptidáz aktivitású PBP4, PBP5 és PBP6 az el nem használt penta-peptideket elbontják, hogy az érett murein csak akceptor-ként vehessen részt a keresztkötésképzésben, az endopeptidáz aktivitással is rendelkező PBP4 meglévő keresztkötéseket hidrolizál az elongáció közben. A transzglikoziláz-transzpeptidáz aktivitású PBP3 az elongációban nem vesz részt, de a szeptumszintézishez esszenciális.

A szeptáció, a poláris sapka kialakulása tér- és időbeli kontroll alatt áll. A szeptumképződés során (legalább 15 gén termékének részvételével) új murein kettős-réteg szintetizálódik, a folyamat végén murein hidrolázok a lánysejtek mureinjét elhasítják egymástól, integritásuk elvesztése nélkül.

A transzpeptidációs reakcióhoz az elongáció során pentapeptid-, míg a szeptumspecifikus enzimek működéséhez elsősorban tripeptid-oldalláncok szükségesek. A kétféle oldallánc aránya függ a terminális D-alanin dipeptideket szintetizáló és a lánchoz kapcsoló enzimek, továbbá a terminális D-alanint eltávolító enzimek aktivitásától. Begg és mtsai (1990) szerint az UDP-NAcMur-pentapeptid:UDP-NAcMur-tripeptid arány változása vezérelné, hogy a sejt mikor váltson át szeptumképzésre az elongációról.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- Appleyard, R. K.** 1954. Segregation of new lysogenic types during growth of a double lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **39**:440-452
- Bachmann, B.** 1983. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 7. *Microbiol. Rev.* **47**:180-230.
- Bachmann, B.** 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- Balikó, G., A. Raukas, I. Boros, and P. Venetianer.** 1988. An *Escherichia coli* gene in search of a function. *Mol. Gen. Genet.* **211**:326-331.
- Begg, K. J., A. Takasuga, D. H. Edwards, S. J. Dewar, B. G. Spratt, H. Adachi, T. Ohta, H. Matsuzawa, and W. D. Donachie.** 1990. The balance between different peptidoglycan precursors determines whether *Escherichia coli* cells will elongate or divide. *J. Bacteriol.* **172**:6697-6703.
- Bi, E. and J. Lutkenhaus.** 1990. Interaction between the *min* locus and FtsZ. *J. Bacteriol.* **172**:5610-5616.
- Bi, E. and J. Lutkenhaus.** 1991. FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**:161-164.
- Bi, E. and J. Lutkenhaus.** 1992. Isolation and characterization of *ftsZ* alleles that affect septal morphology. *J. Bacteriol.* **174**:5414-5423.
- Bi, E. and J. Lutkenhaus.** 1993. Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J. Bacteriol.* **175**:1118-1125.
- Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**:1513.
- Blattner, F. R., V. Burland, G. Plunkett III, H. J. Sofia and D. L. Daniels.** 1993. Analysis of the *Escherichia coli* genome. IV. DNA sequence of the region from 89.2 to 92.8 minutes. *Nucl. Acids Res.* **21**:5408-5417.
- Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Green, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, H. W. Boyer, J. H. Crosa and S. Falkow.** 1977. Construction and characterization new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.



Boros, I. 1984. *Escherichia coli* riboszómális RNS operon promotereinek izolálása, azonosítása és felhasználása *in vitro* DNS rekombinációval. Kandidátusi értekezés.

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

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

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

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

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

Brosius, J., T. J. Dull, D. D. Sletter, and H. F. Noller. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**:107-127.

Cavalier-Smith, T. 1987. Bacterial DNA segregation: Its motors and positional control. *J. Theor. Biol.* **127**:361-372.

Chang, A. C. Y., and S. N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* **134**:1141-1156.

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

Cook, W. R., T. J. MacAlister, and L. I. Rothfield. 1986. Compartmentalization of the periplasmic space at division sites in gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* **168**:1430-1438.

Cook, W. R., F. Joseleau-Petit, T. J. MacAlister and L. I. Rothfield. 1987. Proposed mechanism for generation and localization of new division sites during the division cycle of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:7144-7148.

Cooper, S. 1991. Synthesis of the cell surface during the division cycle of rod-shaped, gram-negative bacteria. Microbiol. Rev. **55**:649-674.

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

Dagert, M., and S. D. Ehrlich. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene **6**:23-28.

de Boer, H. A., L. J. Comstock and M. Vasser. 1983. The *tac* promoter: a functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. Proc. Natn. Acad. Sci. USA **80**:21-25.

de Boer, P. A. J., W. R. Cook, and L. I. Rothfield. 1990. Bacterial cell division. Annu. Rev. Genet. **24**:249-274.

Donachie, W.D. 1993. The cell cycle of *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. **47**:199-230.

Doublet, P., J. van Heijenoort, and D. Mengin-Lecreulx. 1992. Identification of the *Escherichia coli murI* gene, which is required for the biosynthesis of D-glutamic acid, a specific component of bacterial peptidoglycan. J. of Bacteriol. **174**:5772-5779.

Doublet, P., J. van Heijenoort, J. P. Bohin, and D. Mengin-Lecreulx. 1993. The *murI* gene of *Escherichia coli* is an essential gene that encodes a glutamate racemase activity. J. Bacteriol. **175**:2970-2979.

Dougherty, T. J., J. A. Thanassi, and M. J. Pucci. 1993. The *Escherichia coli* mutant requiring D-glutamic acid is the result of mutations in two distinct genetic loci. J. Bacteriol. **175**: 111-116.

Erdei, S., I. Boros, G. Szabó, and P. Venetianer. 1983. A novel type of bacterial transcription unit specifying mRNA, rRNA and tRNA. Mol. Gen. Genet. **191**:162-164

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

Gellert, M., K. Mizuchi, M. O'Dea, and H. A. Nash. 1976. DNA gyrase: enzyme that introduces superhelical turns into DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**:3872-3876.

Gouy, M. and Gautier, C. 1982. Codon usage in bacteria: Correlation with gene expressivity. *Nucl. Acids Res.* **10**:7055-7074.

Gustafsson, C. and S. R. Warne. 1992. Physical map of the *oxyR-trmA* region (minute 89.3) of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.* **174**:7878-7879.

Hamilton, C. M., M. Aldea, B. K. Washburn, P. Babitzke, and S. R. Kushner. 1989. New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:4617-4622.

Haring, V., P. Scholz, E. Scherzinger, J. Frey, K. Derbyshire, G. Hatfull, N. S. Willets, and N. Bagdasarian. 1985. Protein *repC* is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6090-6094.

Hashimoto-Gotoh, T. F. C. H. Franklin, A. Nordheim, and K. N. Timmis. 1981. Specific purpose plasmid cloning vectors I. Low copy number, temperature sensitive, mobilization-defective pSC101-derived containment vectors. *Gene* **16**:227-235.

Heller, K., B. J. Mann and R. J. Kadner. 1985a. Cloning and expression of the gene for the vitamin B₁₂ receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**:896-903.

Heller, K. and R. J. Kadner. 1985b. Nucleotide sequence of the gene for the vitamin B₁₂ receptor protein in the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **161**:904-908.

Higgins, C. F., Ch. J. Dorman, D. A. Stirling, L. Waddell, I. R. Booth, G. May, and E. Bremer. 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell* **52**:569-584.

Hiraga, S. 1993. Chromosome partition in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **5**:789-801.

Hiraga, S., H. Niki, K. Ogura, Ch. Ichinose, H. Mori, B. Ezaki, and A. Jaffé. 1989. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*: novel mutants producing anucleate cells. *J. Bacteriol.* **171**:1496-1505.

Hirota, Y., A. Ryter, and F. Jacob. 1968. Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the process of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **33**:677-693.

- Hoffmann, B. W. Messer and U. Schwarz. 1972. Regulation of polar cap formation in the life cycle of *Escherichia coli*. J. Supramol. Struct. 1:29-37.
- Hudson, I., J. Rossi, and A. Landy. 1981. Dual function transcripts specifying tRNA, and mRNA. Nature 294:422.
- Huisman, O. and R. D'Ari. 1981. An inducible DNA-replication-cell division coupling mechanism in *E. coli*. Nature 290:797-799.
- Hussain, K., K. J. Begg, G. P. C. Salmond, and W. D. Donachie. 1987. *parD*: a new gene coding for a protein required for partitioning and septum localization in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 1:73-81.
- Jacob, F., S. Brenner, and F. Cuzin. 1963. On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:329-348.
- Jaffé, A., R. D'Ari, and V. Norris. 1986. SOS-independent coupling between DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 165:66-71.
- Jaffé, A., R. D'Ari, and S. Hiraga. 1988. Minicell forming mutants in *Escherichia coli*: production of minicells and anucleate rods. J. Bacteriol. 170:3094-3101.
- Kálmán, M., D. R. Gentry and M. Cashel. 1991. Characterization of the *Escherichia coli* K12 *glts* glutamate permease gene. Mol. Gen. Genet. 225:379-386.
- Kato, J., Y. Nishimura, R. Imamura, H. Niki, S. Hiraga, and H. Suzuki. 1990. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *Escherichia coli*. Cell 63:393-404.
- Kiss, A., B. Sain, I. Kiss, I. Boros, A. Udvardy and P. Venetianer. 1978. Cloning of an *E. coli* ribosomal RNA gene and its promoter region from *rif^r*18. Gene 4:137-152.
- Kiss, A., B. Sain and P. Venetianer. 1977. The number of rRNA genes in *Escherichia coli*. FEBS Lett. 79:77-79.
- Kiss, I., K. Slaska, J. Sümegi, A. Udvardy, P. Venetianer, and H. Delius. 1980. RNA-polymerase binding at the promoters of the rRNA genes of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Acta 609:435-447.
- Konigsberg, W. and G. Nigel Godson. 1983. Evidence for use of rare codons in the *dnaG* gene and other regulatory genes of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:687-691.

Laemmlı, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685

Lobner-Olesen, A. and P. L. Kuempel. 1992. Chromosome partitioning in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**:7883-7889.

Lugtenberg, E. J. J., H. J. W. Wijsman, and van D. Zaane. 1973. Properties of a D-glutamic acid requiring mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **114**:499-506.

Lukacsovich, T., A. Orosz, G. Balikó, and P. Venetianer. 1990. A family of expression vectors based on the *rrnB* P2 promoter of *Escherichia coli*. *J. Biotech.* **16**:43-56.

Lutkenhaus, J. 1993. *Escherichia coli* cell division. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **3**:783-788.

Maniatis, T., E. F. Fritsch and J Sambrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mengin-Lecreulx, D., L. Texier, M. Rousseau, and J. van Heijenoort. 1991. The *murG* gene of *Escherichia coli* codes for the UDP-N-acetylglucosamine:N-acetyl-muramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase involved in the membrane steps of peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* **174**:5772-5779.

Miller, J. H. 1972. *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Mulder, E., M. El' Bouhali, E. Pas, and C. L. Woldringh, 1990. The *Escherichia coli minB* mutation resembles *gyrB* in defective nucleoid segregation and decreased negative supercoiling of plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **221**:87-93.

Mulder, E. and C. L. Woldringh. 1989. Actively replicating nucleoids influence positioning of division sites in *Escherichia coli* filaments forming cells lacking DNA. *J. Bacteriol.* **171**:4303-4314.

Mulder, E. and C. L. Woldringh. 1991. Autoradiographic analysis of diaminopimelic acid incorporation in filamentous cells of *Escherichia coli*: Repression of peptidoglycan synthesis around the nucleoid. *J. Bacteriol.* **173**:4751-4756.

Mulder, E. and Woldringh, C. L. 1993. Plasmolysis bays in *Escherichia coli*: Are they related to development and positioning of division sites? *J. Bacteriol.* **175**:2241-2247.

O'Farrell, P. H. O. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**:4007-4021.

Orr, E., N. Fairweather, I. Holland, and R. Pritchard. 1979. Isolation and characterization of a strain carrying a conditional lethal mutation in the *cou* gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **177**:103-112.

Park, J. T. 1987a. The murein sacculus. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Editor in chief: F. C. Neidhardt. American Society for Microbiology. Washington, DC. pp 23-30.

Park, J. T. 1987b. Murein synthesis. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Editor in chief: F.C. Neidhart. American Society for Microbiology. Washington, DC. pp 663-671.

Pruss, G. J. 1985. DNA topoisomerase I mutants: increased heterogeneity in linking number and other replicon-dependent changes in DNA supercoiling. *J. Mol. Biol.* **185**:51-63.

Pucci, M. J., L. F. Discotto, and Th. J. Dougherty. 1992. Cloning and identification of the *Escherichia coli murB* DNA sequence, which encodes UDP-acetylenolpyruvyl-glucosamine reductase. *J Bacteriol.* **174**:1690-1693.

Richardson, S. M., C. F. Higgins and D. M. J. Lilley. 1988. DNA supercoiling and the *leu-500* promoter mutation of *Salmonella typhimurium*. *EMBO J.* **7**:1863-1869.

Rose, R. E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucl. Acids Res.* **16**:355.

Ruberti, I., F. Crescenzi, L. Paolozzi, and P. Gheraldini. 1991. A class of *gyrB* mutants, substantially unaffected in DNA topology, suppresses the *Escherichia coli* K12 *ftsZ84* mutation. *Mol. Microbiol.* **5**:1065-1072.

Ruvkun, G. B. and F. M. Ausubel. 1981. A general method for site-directed mutagenesis in prokaryotes. *Nature* **289**:85-88.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Scheibe, U. 1987. Klonierung und expression eines proteingens aus dem *rrnB* operon von *Escherichia coli*. Inaugural-dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereiches Chemie der Freien Universität Berlin.

Shure, M., D. E. Pulleyblank and J. Vinograd. 1977. The problems of eukaryotic and prokaryotic DNA packaging and *in vivo* conformation posed by superhelix density heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **4**:1183-1205.

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

Steck, T. R. and K. Drlica. 1984. Bacterial chromosome segregation: evidence for gyrase involvement in decatenation. *Cell* **36**:1081-1088.

Sutcliffe, J. G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**:77-90.

Tétart, F., R. Albigot, A. Conter, E. Mulder, and J.-P. Bouché. 1992. Involvement of FtsZ in coupling of nucleoid separation with septation. *Mol. Microbiol.* **6**:621-627.

Trun, N. J. and S. Gottesman. 1990. On the bacterial cell cycle: *Escherichia coli* mutants with altered ploidy. *Genes & Develop.* **4**:2036-2047.

Trun, N. J. and S. Gottesman. 1991. Characterization of *Escherichia coli* mutants with altered ploidy. *Res. Microbiol.* **142**:195-200.

Varenne, S., J. Buc, R. Lloubes and C. Lazdunski. 1984. Translation is a non-uniform process. Effect of tRNA availability on the rate of elongation of nascent polypeptide chains. *J. Mol. Biol.* **180**: 549-576.

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

Woldringh, C. L., E. Mulder, P. G. Huls, and N. Vischer. 1991. Toporegulation of bacterial division according to the nucleoid occlusion model. *Res. Microbiol.* **142**:309-320.

Woldringh, C. L., E. Mulder, J. A. C. Valdenburg, F. B. Wientjes, A. Zaritsky, and N. Nanninga. 1990. Role of the nucleoid in the toporegulation of division. *Res. Microbiol.* **141**:39-49.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103-119.