

A BACILLUS SPHAERICUS MODIFIKÁCIÓS METILÁZ
GÉNJÉNEK SZERKEZETE

Doktori dolgozat

Pósfai György
(MTA SzBK Biokémiai Intézet)

Szeged

1983

B. 4326



RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

r-m	restrikciós-modifikációs
A	adenin
T	timin
G	guanin
C	citozin
U	uracil
Bsp	Bacillus sphaericus
Tc	tetraciklin
bp	bázispár
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
DTT	ditiotreitól
ME	merkaptó-etanol
SDS	nátrium-dodecilszulfát
Tris	trisz-/hidroximetil/-aminometán
cpm	radioaktív beütés/perc
PEG	polietilén-glikol
ATP	adenozin-trifoszfát
dNTP	dezbzinukleozid-trifoszfát
BLIPEN	Bacillus licheniformis penicillináz gén
BSUAMI	Bacillus subtilis amiláz gén
BSPMET	Bacillus sphaericus metiláz gén
ECOMET	Eco RI metiláz gén
ECOMIX	E. coli gének reprezentatív mintája
E.coli	Escherichia coli

DMS	dimetil-szulfát
HZ	hidrazin
TNE	Tris, NaCl, EDTA
TE	Tris, EDTA

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	1. oldal
Előzetes információk a Bsp RI metilázról	2. "
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	8. "
Baktériumtörzsek	8. "
Enzimek	8. "
Jelzett nukleotidok	8. "
Egyéb anyagok, oldatok	9. "
Plazmid DNS tisztítás	9. "
DNS-fragmentek izolálása	10. "
DNS-fragmentek terminális foszfátcsoport- jának eltávolítása	11. "
DNS-fragmentek radioaktiv jelölése	11. "
A DNS elválasztása a be nem épült radioaktiv nukleotidoktól	13. "
DNS-szekvenciázás	14. "
In vitro transzkripció	17. "
Egyéb módszerek	18. "
EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ	19. "
A Bsp RI metiláz gén restrikciós térképe	19. "
A gén nukleotid sorrendje	19. "
Leolvasási fázisok	22. "
Transzkripció iniciáció	24. "
Transzkripció termináció	26. "
Transzláció iniciáció	28. "
Bázisösszetétel, kodonhasználat	33. "
A metiláz elsődleges és másodlagos szerkezete	35. "
ÖSSZEFOGLALÁS	38. "
IRODALOMJEGYZÉK	40. "
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	44. "

BEVEZETÉS

A DNS-ben tárolt információ fennmaradása és megnyilvánulása első fokon specifikus fehérje-DNS kapcsolatokon keresztül valósul meg. Ezeknek a specifikus kapcsolatoknak a megismeréséhez segítséget nyújt az un. II. típusu restriktív-modifikációs rendszerek tanulmányozása. A számos prokariótában megtalálható r-m rendszerek egy restriktív endonukleázból és egy modifikációs metilázból állnak. A két enzim ugyanazokat a rövid, meghatározott bázissorrendű DNS-szakaszokat ismeri fel. A metiláz metilálja ezeket a szakaszokat, ezáltal a DNS védetté válik az ugyanitt hasítani igyekvő restriktív endonukleázzal szemben. A két enzim szigorú szekvenciaspecifitása, hatásmódjuk viszonylagos egyszerűsége, valamint annak révén, hogy azonos DNS-szakaszokat ismernek fel, hasznos kísérleti objektumai a specifikus fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatának. Az összehasonlító vizsgálatok fényt deríthetnek szerkezet és funkció kapcsolatára, a szekvencia-specifitás strukturális alapjára. Növeli az összehasonlítási lehetőségeket, hogy számos, azonos felismerési hellyel rendelkező restriktív endonukleáz és modifikációs metiláz ismeretes /izoschizomerek/.

Az enzimek direkt vizsgálatánál egyszerűbb a DNS oldaláról közelíteni: a gének nukleotid sorrendjét meghatározva megállapíthatjuk a fehérjék aminosav sorrendjét. Bár több restriktív endonukleáz és modifikációs metiláz génjét klónozták már, eddig csupán egyetlen II. típusu r-m rendszer génjeinek nukleotid szekvenciája ismert /1,2/.

Az SzBK Biokémiai Intézetében három, különböző mikroorganizmusokból származó /B. sphaericus, B. subtilis, SP β -fág/ metiláz génjét klónozták E. coliban /3,4/.

A három metiláz nem mutat hasonlóságot sem méretben, sem - a DNS-DNS hibridizációs kísérletek tanúsága szerint - DNS-szinten. Abban azonban közösek, hogy a DNS GGCC bázisnégyeseit ismerik fel, és metilálják. /Az SP β -fág metiláza egyéb specifitással is rendelkezik/.

A három izoschizomer igen alkalmas kísérleti rendszer a specifikus fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatához. Első lépésként célul tűztük ki a Bsp RI metiláz gén részletes strukturális vizsgálatát, nukleotid sorrendjének megállapítását.

A gén szerkezetének tanulmányozása önmagában is jelentőséggel bír, hiszen annak ellenére, hogy a restrikciós endonukleázokat, mint a génszabás alapvető eszközeit széles körben használjuk, magukról a r-m rendszerekről, enzimológiájukról, genetikájukról, in vivo szerepükről alig tudunk valamint.

Gram⁺ mikroorganizmusból eddig csak néhány gén és transzkripció, transzláció szignál szekvenciája ismeretes, így ezekhez is egy adalék a dolgozat.

Előzetes információk a Bsp RI metilázról

A kísérletek tervezésénél, az eredmények magyarázatánál néhány, mások által korábban elvégzett kísérlet ada-

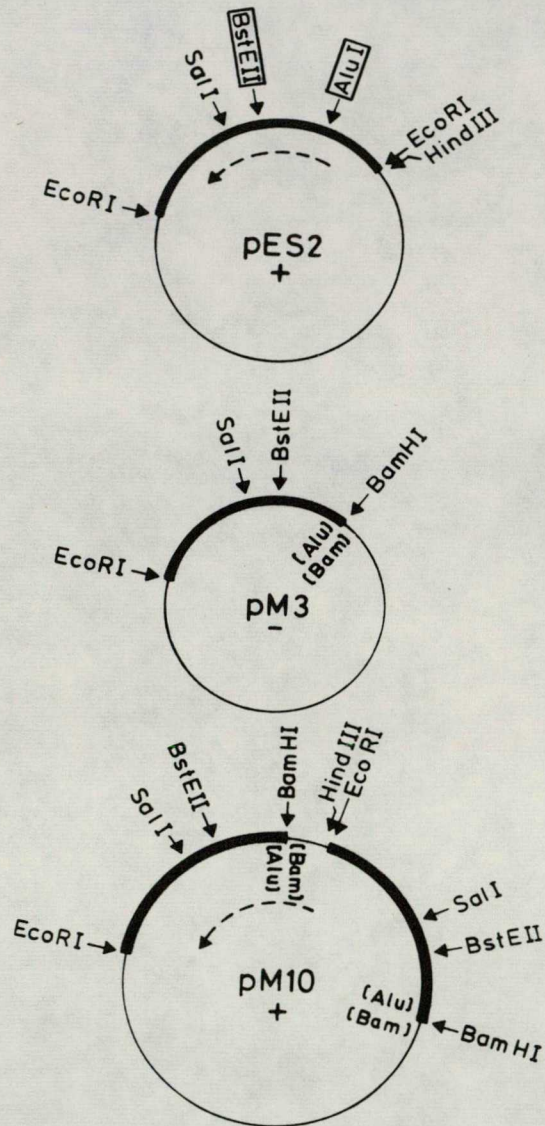


tait is felhasználtuk. Az alábbiakban röviden összegezzük a Bsp RI metilázról szerzett előzetes információinkat.

A Bsp RI metiláz a DNS palindrom GGCC tetranukleotid szakaszait ismeri fel. S-adenozil-metionin metildonor felhasználásával metilálja a belső citozint az 5. szénatomon, így a DNS védett lesz a Bsp RI restrikciós endonukleáz hasításával szemben. A Bsp RI metiláz molekulásúlya 50 000 - 52 000 D /5/.

Szomolányi és mtsai a metiláz génjét a gén expresszióján alapuló módszerrel E. coliban klónozták /3/. Az 1. ábrán látható pES2 plazmid egy pBR322 vektorból és a Bacillus kromoszóma egy szakaszából áll. Ezen az Eco RI enzimmel kivágható szakaszon található az intakt metiláz gén. A pES2 plazmidról E. coliban aktiv Bsp metiláz képződött - ezt a plazmid Bsp RI restrikciós endonukleázzal szembeni rezisztenciája jelzi.

A gén további jellemzésére, pontosabb behatárolására Kiss Antal szubklónozási kísérleteket végzett. A 2500 bp-os Eco RI - Eco RI fragmentet elhasította Alu I enzimmel, és az 1880 bp-os Alu I-Eco RI szubfragmentet beépítette a vektorba /Eco RI-Bam HI helyre/ /1. és 3. ábra/. Erről a pM3 elnevezésű plazmidról nem fejeződött ki a metiláz. A klónok elemzésekor viszont sikerült találni egy metiláz pozitív konstrukciót is. Kiderült, hogy ez a pM10 plazmid /1. ábra/ kétszeresen tartalmazza az



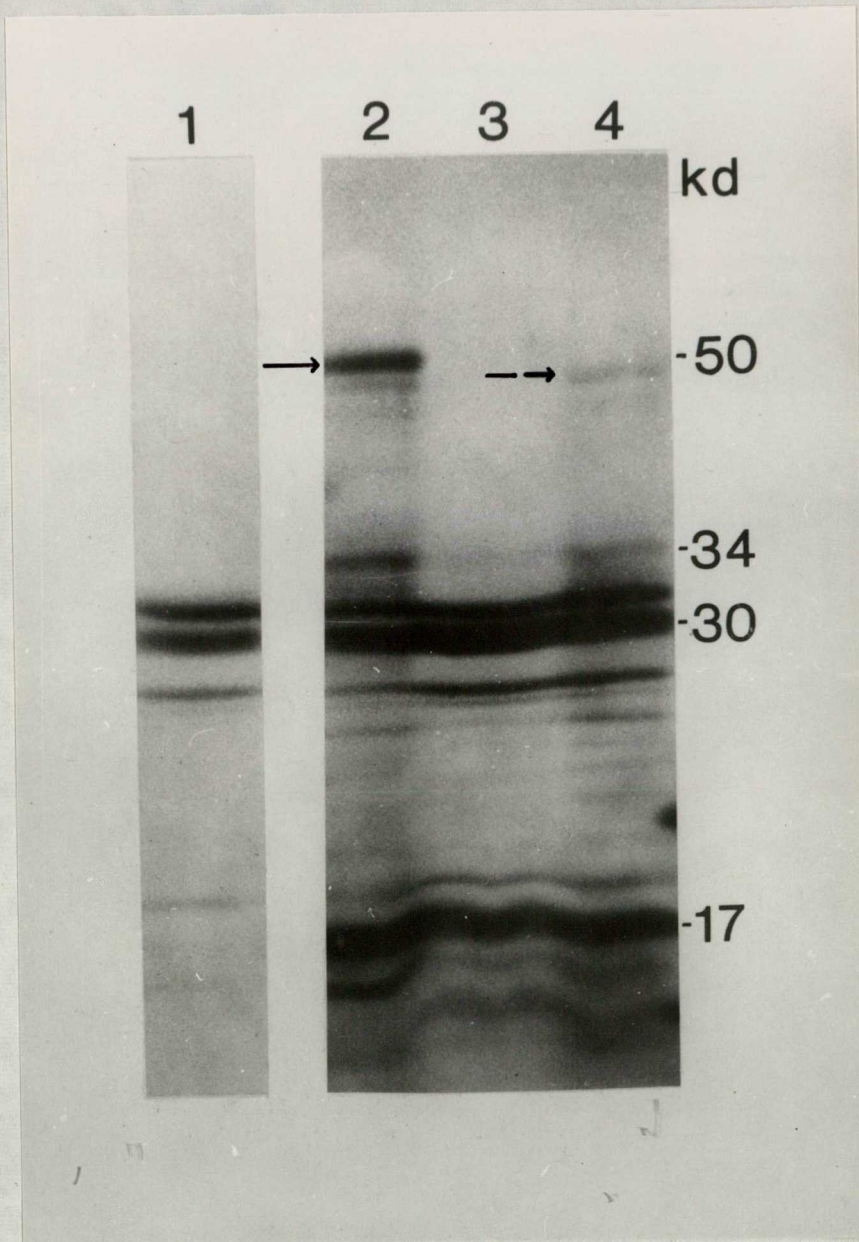
1. ábra. A pES2, pM3 és pM10 plazmidok restrikciós térképe. A vektor DNS-t vékony, a *B. sphaericus*-ból származó inzertet vastag vonal jelöli. A + és - jelek arra utalnak, hogy a plazmid metilációs fenotípust mutat-e *E. coli*-ban. A szaggatott nyíl a transzkripció irányát jelzi. A zárójelbe tett hasítóhely nevek arra vonatkoznak, hogy milyen fragmentvégek lettek összeépítve.

Alu I-Eco RI fragmentet. A két kópia közé a vektor Bam HI-Eco RI fragmentje épült be, mely a vektor Tc gén-jének Eco RI →Bam HI irányban működő promoterét hordozza.

Mindezekből a következőket állapíthatjuk meg:

- Az 1880 bp hosszúságú Alu I-Eco RI szakasz hordozza az aktiv enzimet kódoló részt.
- Az Alu I enzim hasításával eltávolítottuk a gén saját promoterét. Idegen promoterrel helyettesítve a gén ismét működőképessé vált.
- A transzkripció iránya Alu I→Eco RI hasítóhely.
- A fehérjeméretből becslés alapján egy 1300-1600 bp hosszúságú kódoló szakaszra számíthatunk.

Erdei Sára /SzBK Biokémiai Intézet/ E. coli minisejt kísérleteket végzett a fenti plazmidokkal. /A minisejt citoplazmatikus lefűződés, mely - teljes transzkripciós és transzlációs apparátusa révén - extrakromoszomális DNS-elemek fehérjeproduktumainak kimutatására jól használható/. A plazmidokról képződő fehérjemolekulák SDS-gél-elektroforetikus képét a 2. ábra mutatja. A képen az üres vektor /1./ és a pES2 /2./, pM3 /3./, pM10 /4./ plazmidok által kódolt fehérjék láthatók. A 2. oszlopban a nyillal jelölt csík reprezentálja az 50 000 D molekulasúlyú Bsp metilázt. A pM3 plazmid nem mutat metiláz aktivitást, a gélképen hiányzik a metiláz csíkja. Bár a pM10 plazmidról aktiv metiláz termelődött /ezt a plazmid



2. ábra. Fehérjeszintézis *E. coli* minisejtekben. A sejtek a pBR322 /1. oszlop/, pES2 /2./, pM3 /3./ és pM10 /4./ plazmidokat tartalmazák. Az ábrán a 12.5 %-os poliaktrilamid gél autoradiogramja látható. A fehérjemolekulák jelölése ^{35}S metioninnal történt. A nyilak az 50 000 ill. 48 000 D-os fehérjéket jelzik.

Bsp RI restrikciós endonukleázzal szembeni rezisztenciája jelzi/, az 50 000 D molekulásulyu fehérje itt is hiányzik. Megjelenik azonban egy valamivel kisebb, 48 000 D-os fehérjemolekula /szaggatott nyillal jelölve/. Ugy tűnik, az Alu I enzim hasításával nemcsak a gén promoterét távolítottuk el, hanem a kódoló rész elejét is. A Bsp metiláz aktivitását megőrző rövidebb molekula csikja halványan a pES2 plazmid oszlopában is megtalálható.

A kísérleti eredmények pontosabb magyarázatához a DNS-szekvencia ismerete szükséges.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Baktériumtörzsek

- E. coli HB 101 recA, r_B⁻ m_B⁻
- Bacillus sphaericus R /3/

Enzimek

- Restrikciós endonukleázok:
Eco RI, Sal I, Xba I, Ava II, Sau 3A, Mbo II,
Bam HI, Bsp I /az SzBK Biokémiai Intézetében
preparáltak/, Hinf I /Dr. M. Hartmann, Jena/,
Taq I, Rsa I, Bst EII /New England Biolabs/
- Polinukleotid-kináz /SzBK Biokémiai Intézet/
- T4 DNS-ligáz /SzBK Biokémiai Intézet/
- E. coli RNS-polimeráz /SzBK Biokémiai Intézet/
- DNS-polimeráz Klenow-fragment /BRL/
- E. coli alkalikus foszfatáz /Worthington/
- Lizozim /Reanal/

Jelzett nukleotidok

-{ γ ³² P}ATP	spec. akt.	> 1000 Ci/mmol
-{ α ³² P}ATP	spec. akt.	> 1000 Ci/mmol
-{ γ ³² P}dATP	spec. akt.	> 1000 Ci/mmol

A jelzett nukleotidok az SzBK-ban, New England Nuclear ³²P-ortofoszfát felhasználásával, Walseth és Johnson módszere alapján készültek /6/.

Egyéb anyagok, oldatok

- agaróz /Sigma/
- hidrazin /Eastman Kodak/
- dimetil-szulfát /Merck/
- piperidin /Merck/
- DMS-stop /1.5 M Na-acetát, pH 7.0, 1 M ME, 100 µg/ml tRNS/
- DMS-puffer /50 mM Na-kakodilát, pH 8.0, 1 mM EDTA/
- HZ-stop /0.3 M Na-acetát, 0.1 mM EDTA, 25 µg/ml tRNS/
- M9 táptalaj /6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl
1 literre, pH 7.0/
- TNE /0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA/
- TE /10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM EDTA/

Plazmid DNS tisztítás

A baktérium-kulturát 37°C-on OD₅₅₀=0.9-1.0-ig növesztjük 1 liter M9 tápoldatban /kiegészítve 0.5-2 % casamino-savval, 10 ml 50 %-os glükózzal, 50 mg B1 vitaminnal, 100 µg/ml ampiciillinnel/, ekkor 5 ml 34 mg/ml-es kloramfenikol oldatot adunk hozzá. További 12-16 órát rázatjuk, majd jégen lehütjük, és centrifugáljuk /1000 g, 30 perc/. A sejtfeltárást 0°C-on végezzük. A bakteriális üledéket 100-200 ml 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA oldatban szuszpendáljuk, majd lecentrifugáljuk. 80 ml 50 mM Tris-HCl

pH 7.5 oldatban homogén állapotúra szuszpendáljuk az üledéket. 200 mg lizozimet /50 mM Tris-HCl pH 7.5 oldatban felhasználás előtt oldva/ adunk hozzá, megkeverjük, 10 percet jégben állni hagyjuk. 25 ml 250 mM EDTA pH 8.0 oldatot adunk az elegyhez, megkeverjük, 10 percet jégben állni hagyjuk. 5 ml 2 %-os Triton X 100 hozzáadása után 1 órát jégen hagyjuk, majd centrifugáljuk /5000 g, 60 perc, 2°C/. A felüluszóhoz 0.5 térfogat TNE oldattal telített fenolt és ugyanennyi kloroformot adunk. Alapos extrahálás után centrifugáljuk /1000g, 10 perc/, a vizes fázist leszívjuk. Kétszeri, alapos kloroformozással /azonos térfogattal/ eltávolítjuk a fenolmaradványokat. A vizes fázishoz 25-50 µg/ml RNázt adunk, 1 órát 37°C-on inkubáljuk. 0.2 térfogat 5 M NaCl-dal egészítjük ki az elegyet. Az így kialakult térfogat 1/3-ának megfelelő 30 % PEG 6000 oldatot adunk hozzá. Éjszakán át jégben állni hagyjuk. Centrifugáljuk /6500 g, 30 perc, 2°C/, a csapadékot néhány ml TNE oldatban vesszük fel. A DNS-t alkoholos kicsapással, mosással tisztítjuk, végül 1-2 ml TE pufferben oldjuk. A DNS koncentrációját 260 nm hullámhossznál mért UV abszorpciója alapján állapítjuk meg.

DNS-fragmentek izolálása

A plazmid DNS restrikciós enzimes emésztését a New England Biolabs által javasolt reakciókörülmények között

végeztük /7/. Az emésztési termékeket agaróz vagy poli-
akrilamid gélelektroforézissel választottuk el egymástól
/22/. A megfelelő DNS-csíkot tartalmazó géldarabkát kivág-
tuk, majd a DNS-t elektroelucióval kis dializáló-hártya
zacskóba juttattuk. A zacskó tartalmát szilikonozott
üvegyapoton szűrtük át, hogy az agaróz-szemcséktől meg-
szabaduljunk. A DNS-t kétszeri fenolos extrakcióval,
kloroformozással, végül alkoholos kicsapással, mosással
tisztítottuk.

DNS-fragmentek terminális foszfátcsoportjának eltávolítása

A DNS-fragmentet 250 μ l 0.1 M Tris-HCl /pH 8.0/ puffer-
ben vesszük fel. 1 μ l alkalikus foszfátot adunk hozzá
/0.1 - 0.01 egység/, 30 percig 60°C-on inkubáljuk. 250 μ l
TE pufferrel telített fenolt adunk az elegyhez. Alapos
extrahálás és rövid centrifugálás után a vizes fázist le-
szívjuk, majd a fenolozást még kétszer megismételjük. A
fenolnyomokat kloroformos extrakcióval távolítjuk el,
végül a DNS-t 0.25 M Na-acetát jelenlétében 2-3 térfogat
etanollal csapjuk ki.

DNS-fragmentek radioaktív jelölése

A DNS-fragmentek jelölésére a polinukleotid-kináz ill. a
DNS-polimeráz Klenow-fragmentje által katalizált reakció-

kat használtuk fel. A következő elegyeket állítjuk össze:

A. DNS-fragmentek tulnyuló 5' végének jelölése

5 μ l defoszforilált DNS /1-50 pmol 5' vég/

35 μ l desztillált víz

5 μ l 500 mM Tris-HCl /pH 7.6/, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT,
1 mM spermidin, 1 mM EDTA

5 μ l { γ ³²P}ATP /1000 Ci/mmol, 50 pmol/

1 μ l T4 polinukleotid-kináz /20 egység/

Összekeverjük, 37°C-on 30 percig inkubáljuk.

B. DNS-fragmentek tompa 5' végének jelölése

5 μ l defoszforilált DNS /1-50 pmol 5' vég/

35 μ l 20 mM Tris-HCl /pH 9.5/, 1 mM spermidin,
0.1 mM EDTA

Összekeverjük, 2 percre 90°C-ra helyezzük, jeges vízben hirtelen lehütjük, majd azonnal hozzáadjuk a következőket:

5 μ l 500 mM Tris-HCl /pH 9.5/, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT,
50 % /v/v/ glicerol

5 μ l { γ ³²P}ATP /1000 Ci/mmol, 50 pmol/

1 μ l T4 polinukleotid-kináz /20 egység/

Összekeverjük, 37°C-on 15 percig inkubáljuk.

C. DNS-fragmentek rejtett 3' végének jelölése

5 μ l DNS /10 pmol 3' vég/

30 μ l desztillált víz

2.5 μ l 1 M K-foszfát /pH 7.4/



2.5 µl 0.1 M MgCl₂
2 µl 0.15 M ME
2.5 µl 1 mM dNTP /dCTP, dGTP, dTTP/
5 µl {α³²P}dATP /10 pmol/
1 µl Klenow-fragment
20 perc inkubálás szobahőn.

A DNS elválasztása a be nem épült radioaktív nukleotidoktól

A spermin a 80-100 bázispárnál nagyobb DNS-fragmenteket kicsapja, a rövidebb fragmentek, beépületlen nukleotidok az oldatban maradnak.

- Spermines kicsapás

50 µl reakcióelegy a jelölési reakció végén

4 µl 250 mM EDTA

450 µl desztillált víz

10 µl 100 mM spermin

Összekeverjük, 15 percet állni hagyjuk 0°C-on.

10 percet centrifugáljuk Eppendorf-centrifugában,

a felüluszót leszívjuk.

- Spermin eltávolítás

DNS csapadék

500 µl 75 % etanol, 0.3 M Na-acetát, 10 mM Mg-acetát

1 órát jégen állni hagyjuk, közben néhányszor megke-

verjük. 10 percet centrifugáljuk, a csapadékot 70 %-os

etanollal mossuk.

DNS-szekvenciázás

A DNS-fragmentek nukleotid sorrendjét Maxam és Gilbert kémiai módszere /8/ alapján állapítottuk meg. Ötféle reakciót alkalmaztunk, a DNS molekulák részleges hasítását specifikusan G, G+A, C+T, C és A>C bázisoknál végeztük, 1.5 ml-es Eppendorf-csövekben.

- Specifikus módosító reakciók

G. 200 μ l DMS-puffer

5 μ l DNS

összekeverjük, 0°C-ra hűtjük

1 μ l DMS

megkeverjük, 20°C-on 5+2 percet inkubáljuk

50 μ l DMS-stop /0°C/

Ettől a lépéstől kezdve az összes reakció azonos.

750 μ l 95 %-os etanol /0°C/

keverés, 5 percre folyékony levegőbe mártjuk

5 perc Eppendorf-centrifugálás

a felülusztót leszivjuk

a csapadékot 250 μ l 0.3 M Na-acetátban oldjuk

750 μ l 95 %-os etanol /0°C/

lefagyasztjuk, centrifugáljuk

1 ml 70 %-os etanollal mossuk a csapadékot

lecentrifugáljuk, az alkoholt leszivjuk

a csapadékot néhány percig vákuumban szárítjuk

- G+A. 10 μ l DNS
25 μ l 88 %-os hangyasav /0^oC/
összekeverjük, 20^oC-on 10 \pm 2 percet inkubáljuk
200 μ l HZ-stop /0^oC/
lásd G. reakció
- C+T. 10 μ l desztillált viz
10 μ l DNS
összekeverjük, 0^oC-ra hűtjük
30 μ l HZ
megkeverjük, 20^oC-on 10 \pm 2 percet inkubáljuk
200 μ l HZ-stop
lásd G. reakció
- C. 15 μ l 5 M NaCl
5 μ l DNS
összekeverjük, 0^oC-ra hűtjük
30 μ l HZ
megkeverjük, 20^oC-on 10 \pm 2 percet inkubáljuk
200 μ l HZ-stop
lásd G. reakció
- A>C. 100 μ l 1.2 N NaOH, 1 mM EDTA
5 μ l DNS
megkeverjük, 90^oC-on 10 \pm 5 percet inkubáljuk
150 μ l 1 N ecetsav
5 μ l tRNS /1 mg/ml/
lásd G. reakció

- Piperidines hasítás

100 µl 1 M piperidint mérünk a beszárított csapadék-
ra, erőteljesen megkeverjük
90°C-on 30 percet inkubáljuk
5 percre jégre helyezzük

- Piperidin eltávolítás

a mintákat új csőbe visszük át
25 µl 3 M Na-acetát
1 ml 95 %-os etanol
folyékony levegőbe mártjuk 5 percre
lecentrifugáljuk, a csapadékot 1 ml etanollal mossuk
20 µl desztillált víz
lefagyasztjuk, liofilizáljuk
a DNS-t néhány µl 95 % formamid /v/v/, 20 mM EDTA,
0.03 % /w/v/ xilencianol, 0.03 % /w/v/ brómfenolkék oldat-
ba vesszük fel

- Elektroforézis

A mintákat 8.3 M urea tartalmu, 6,8 és 20 %-os poliakril-
amid géleken futtattuk.

Futási körülmények: 100 mM Tris-borát puffer /pH 8.3/,
2 mM EDTA; 1200 V, 35 mA

A gélek mérete: 400 x 300 x 0.5 mm

A mintákat általában négyfelé osztottuk, az egyes rész-
leteket különböző ideig futtattuk. Az autodiagramokról
leolvasott szekvencia négy felvitel esetén 5-250. bázis
között adta meg a sorrendet. Az autodiagramok Medifort

RP filmmel, erősítő fóliával készültek. Az expozíció időtartama a jel nagyságától függően néhány óra - néhány nap.

In vitro transzkripció

Jelölt transzkriptumok készítéséhez E. coli RNS-polimerázt használtunk. A transzkripció specifikitását heparin hozzáadásával biztosítottuk [23].

10-20 µg/ml DNS-fragment

40 mM Tris-HCl /pH 7.9/

10 mM MgCl₂

150 mM KCl

0.1 mM DTT

0.1 mM EDTA

0.3 µM RNS-polimeráz

37°C-on 5 percet inkubáljuk

100 µg/ml heparin

2 perc további inkubálás

200-200 µM CTP, GTP, UTP

50 µM {α³²P}ATP /10 µCi/

össztérfogat: 25 µl

37°C-on 30 percet inkubáljuk

200 µl 0.1 M Tris-HCl /pH 7.9/, 0.2 % SDS, 100 µg/ml tRNS,

10 mM EDTA

Fenolos extrakció, etanolos kicsapás után a transzkriptumot 95 % formamid, 1 mM EDTA, 0.015 % xiléncianol oldatban vettük fel, 5 % poliakrilamid, 8 M urea gélen futtattuk, majd autoradiogramot készítettünk.

Egyéb módszerek

- A gén restrikciós enzim hasítóhelyeinek részletes térképezését Smith és Birnstiel /9/ módszerével végeztük. A végjelölt DNS-fragmenteket részleges restrikciós enzimes emésztésnek vetjük alá. A jelölt véggel rendelkező termékek egy átfedő sorozatot alkotnak. A sorozat tagjait egy gélen mólsúly szerint szétválasztjuk, majd az enzim hasítóhelyeinek a jelölt végtől való távolságát az autoradiogramról lépcsőszerűen leolvassva megállapítjuk.
- A DNS-szekvencia specifikus szakaszainak keresését, a leolvasási fázisok koordinátáinak meghatározását, az intramolekuláris homológiák vizsgálatát Pósfai János /SzBK, Biofizikai Intézet/ szekvencia-analizáló programjával végeztük, az SzBK TPA-1140 számítógépén.
- A Bsp RI metiláz másodlagos szerkezetének modellje Chou és Fasman predikciós módszere /10, 11/ alapján készült, az SzBK számítógépének felhasználásával.
- Az RNS-molekulák között kialakuló hidrogénhidak révén létrejövő szabadenergia csökkenést Tinoco és mtsai /12/ adatai alapján számítottuk ki.

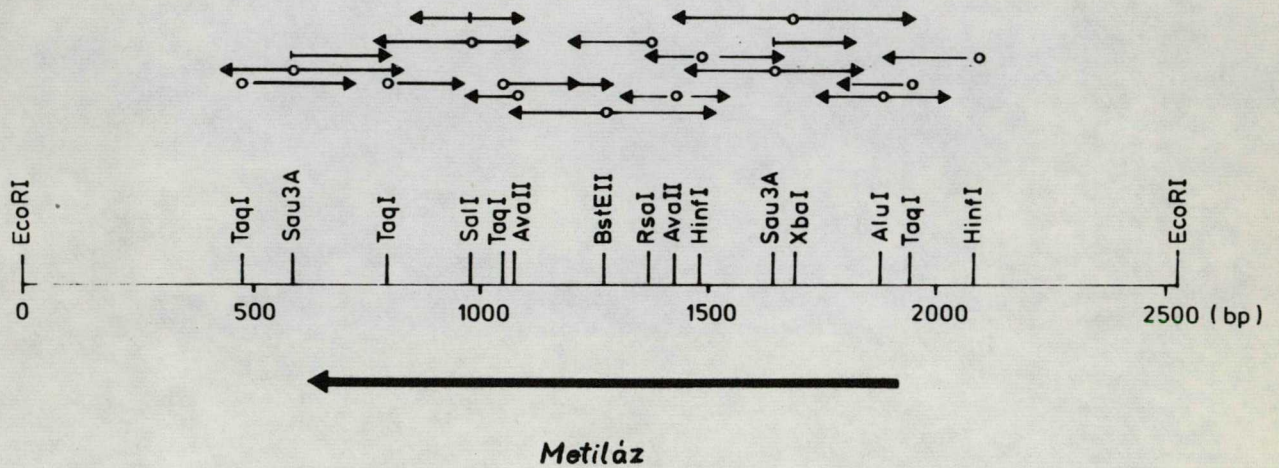
EREDMÉNYEK ÉS DISZKUSSZIÓ

A Bsp RI metiláz gén restrikciós térképe

A klónozott 2500 bázispár hosszúságu Eco RI-Eco RI fragmenten /1. ábra/ restrikciós enzimes térképezést végeztünk. A végjelölt /az Eco RI és a Sal I hasítóhelyen/ fragmenteket részlegesen megemésztettük 28-féle enzimmel. Az emésztési elegyeket 2-3 %-os agaróz, ill. 5 %-os poliakrilamid gélen futtattuk. Az autoradiográfiás kép alapján a jelölt, átfedő emésztési termékeket sorba rendeztük. A szekvenciázásnál végjelöléshez felhasznált restrikciós enzim hasítóhelyeket a 3. ábra mutatja. /A térkép egy részét Kiss Antal már korábban elkészítette/. Érdekesség, hogy GC-gazdag restrikciós endonukleáz hasítóhelyek nincsenek a Bsp RI metiláz génben /Bsp RI, Msp I, Hha I, Fnu DII/.

A gén nukleotid sorrendje

A szekvenáláshoz először nagy mennyiségben tisztítottuk a pES2 plazmidot. Ebből a 2500 bp hosszú Eco RI-Eco RI fragmentet preparatív méretben izoláltuk. A fragmentet különféle restrikciós enzimekkel megemésztettük, a keletkező molekulákat végükön megjelöltük. A szekvenáláshoz olyan DNS- molekulákra van szükség, melyek csak az egyik végükön jelöltek, ezért a mindkét végen jelölődött mole-



3. ábra. Szekvenciázási stratégia.

A nyilak a megszekvenciázott DNS-szakaszok irányát és kiterjedését jelzik. A nyilak kezdeténél található körök 5', a vonalkák 3' végjelölésre utalnak. Az ábrán csak a végjelöléshez felhasznált restriktív enzim hasítóhelyeket tüntettük fel.

kulákat egy alkalmasan választott restriktív enzimmel aszimmetrikusan elhasítottuk, a termékeket izoláltuk. A szekvenálási stratégia a 3. ábráról olvasható le. Maxam és Gilbert /8/ kémiai módszerét alkalmazva több mint 1600 bázispárnyi DNS-szakasz nukleotid sorrendjét határoztuk meg a 3. ábra 450-2060. koordinátái között. Az összes felhasznált restriktív enzim hasítóhelyét átszekvenciáztuk valamelyik szomszédos hasítóhelytől indulva. A bázissorrend megállapításának biztonságát növelte, hogy mindkét DNS-szálat megszekvenciáztuk. Ahol bizonytalanság adódott az autoradiogramok leolvasásánál, több átfedő fragmentet is megvizsgáltunk. A 4. ábrán a megszekvenciázott DNS-szakasz mRNS-sel ekvivalens szálának nukleotid sorrendje látható.

Leolvasási fázisok

A DNS mindkét szálán megvizsgáltuk a potenciális iniciátor kodonoktól /AUG ill. GUG/ a legközelebbi, azonos fázisu terminációs kodonig terjedő nyitott leolvasási sorok hosszát. Az 1. táblázatban az egyes fázisokban adódó leg-hosszabb szakaszokat tüntettük fel. Csupán egyetlen olyan értéket találunk, mely elegendő hosszúságu polipeptidlánc kódolására képes szakaszt reprezentál /1272 bp - 424 aminosav/. Ennek a nyitott leolvasási sornak az orientációja és lokalizációja megegyezik azzal, amit a génről szerzett előzetes információink alapján vártunk /1. ábra/.

1. táblázat. A megszekvenciázott DNS-szakasz leghosszabb nyitott leolvasási sorai.

Fázis	Iniciátor pozíció	Terminátor pozíció	Hossz nukleotidban	Hossz aminosavban
1.	1099 ⁺	1240	141	47
2.	132	1404	1272	424
3.	1507	-	105	35
1.'	1333	1093	240	80
2.'	396 ⁺	306	90	30
3.'	1376	1097	279	93

A + jel GUG iniciátor kodonra utal. Az 1., 2. és 3. fázis a 4. ábrán látható szekvencia transzlációjával kapcsolatos, az 1.', 2.' és 3.' fázis a komplementer száléval. A 3. fázisban a leghosszabb nyitott leolvasási sor kifutott a megszekvenciázott szakaszból. A pozíciókat a 4. ábra koordinátáival adtuk meg.

Transzkripció iniciáció

A transzkripció iniciációjáról számos DNS-szintű adattal rendelkezünk a prokarióták köréből. Kimutatták, hogy az RNS-polimeráz megkötésében, orientálásában a promoter szakasz un. -35 régiójának és a Pribnow-boxnak van fontos szerepe [13, 14]. E régiók bázissorrendje meglehetősen konzervatív, ennek alapján megkísérelhetjük a Bsp RI metiláz gén promoterének kikeresését a DNS szekvenciában.

A kiválasztott nyitott leolvasási sor starthelye környezetében két lehetséges promoter-szekvenciát talá-lunk. Ezek bázissorrendjét a 5. ábra mutatja be, összehasonlítva a számos adatból származtatott általános prokarióta promoterrel. Mindkét potenciális promoter meglehetősen "jó" -35 régióval és Pribnow-boxszal rendelkezik. Mivel a felső sorban a távköz a két fontos régió között az "ideális" 17 nukleotid, ez látszik a valóban funkcionáló promoternek.

A kérdés eldöntésére in vitro transzkripciók kísérleteket végeztünk. E. coli RNS-polimerázzal transzkriptumot készítettünk a feltételezett promotereket tartalmazó izolált DNS-fragmenteken. Az eredményeket a 6. ábra foglalja össze. Ha a transzkripció a javasolt promoteren kezdődik, a Bst EII-Hind III /a Hind III hasítóhely a vektorban van, 1. ábra/ ill. az Rsa I-Rsa I DNS-fragmenten

64

- CATATTTGTCACGACGATGAAGTT CCGTTAAACTTAAGGGATGAG -

- AATTTTTGTCGAAAGGGGCAACAACATGGCTATTAAGATAAATGAAAAAG -

108

-35

Pribnow-box

- TTGACa - - - - TAAAT - -

5. ábra. Potenciális promoter szekvenciák.

Az alsó sorban a tipikus promoter szekvencia leginkább konzervált szakaszait tüntettük fel /13/.

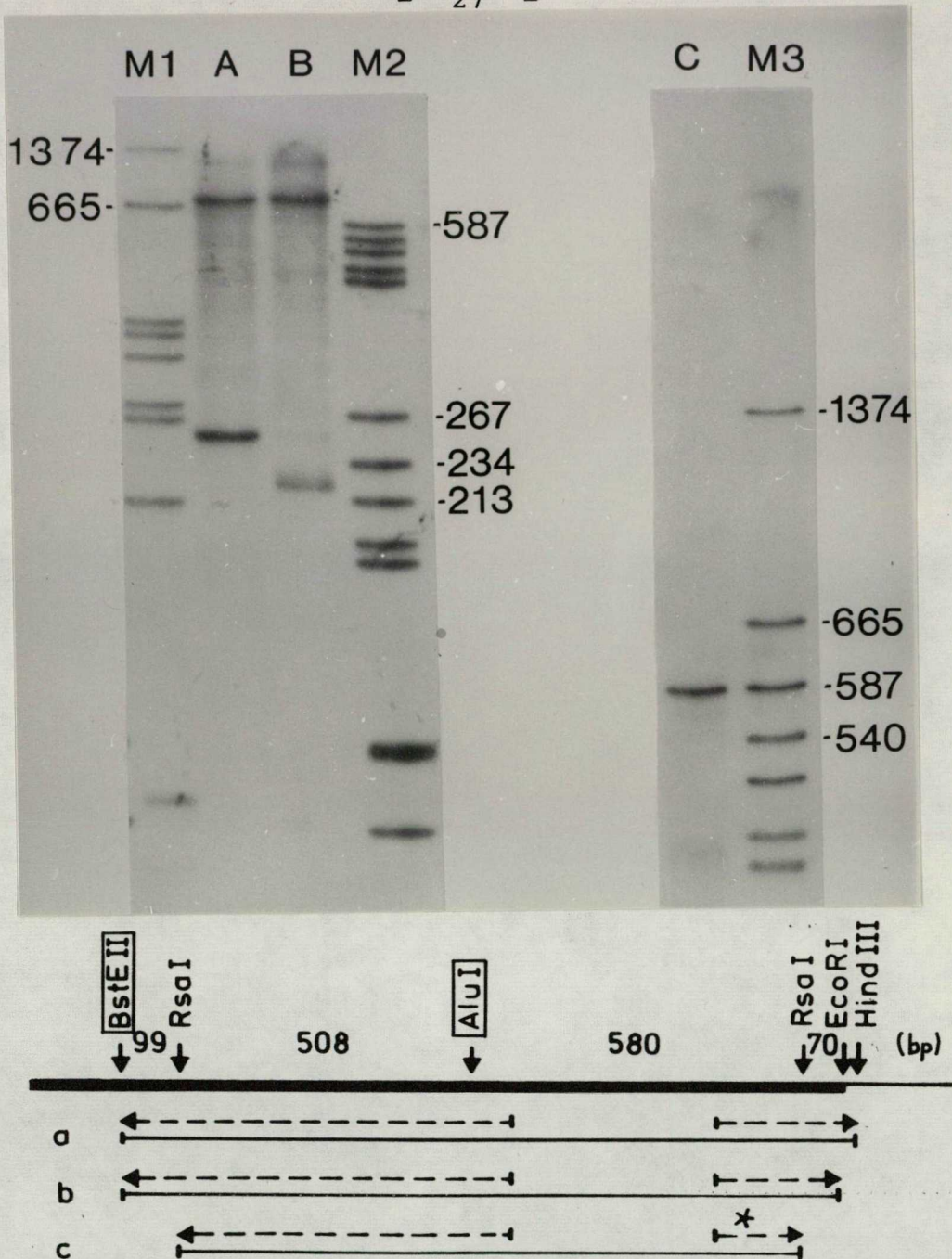
A bekeretezett nagybetűk ≥ 81 %, az aláhuzott nagybetűk ≥ 61 %, a kisbetűk ≥ 46 % gyakoriságra utalnak. A koordinátákat a 4. ábrának megfelelően adtuk meg.

képződő, a starthelytől végigfutó transzkriptumnak 684-687, ill. 581-584 bázis hosszúságúnak kell lennie a szekvencia alapján. /Az RNS-polimeráz a Pribnow-box után 5-8 bázissal kezdi el az RNS szintetizálását/. Az A és C oszlopban valóban megtalálható a megfelelő méretű transzkriptum /680-690 bázisos transzkriptum a Bst EII-Hind III, 580-585 bázisos az Rsa I-Rsa I fragmenten/. A szóbanforgó RNS-molekulák mellett egy kisebb transzkriptum szintézise is megfigyelhető /A oszlop/. Az ennek megfelelő DNS-szakasz a metiláz génen kívülre esik, irányítotttsága pedig fordított, amint azt a megrövidített DNS-templáton /Bst EII-Eco RI/ képződő transzkriptum mérete mutatja /B oszlop/. E szomszédos gén funkciója nem ismert.

Mivel a kísérletekben használt E. coli RNS-polimeráz, - mely kevésbé igényli a promoter konzervatív bázissorrendjét, mint a Bacillus RNS-polimeráz /14/ - a vizsgált régióban csupán egy promotert ismer fel a DNS-en /nem véve figyelembe az ellenkező irányu, metiláz génen kívüli promotert/, arra a következtetésre juthatunk, hogy a metiláz gén funkcionáló promotere azonos a szekvencia alapján javasolttal. /Az 5. ábrán a 64. koordinátával kezdődő sor/.

Transzkripció termináció

A leolvasási sor stop-kodonját követő DNS-szekvenciát



6. ábra. In vitro transzkripció a Bsp RI metiláz gén promoter régióját tartalmazó DNS-fragmenteken. Az autoradiogram 5 %-os denaturáló poliakrilamid gélről készült. Az M1, M2 és M3 oszlopban molekula-méret-markerek találhatóak. Az a, b és c DNS-fragmenteken *E. coli* RNS-polimerázzal szintetizált RNS-molekulák mérete az A, B és C oszlopról olvasható le. A *-gal jelölt transzkriptum kifutott a gélből, ezért nem látható a C oszlopban. A bekeregetezett hasítóhelyek segítik a DNS-szakasz elhelyezését az 1. ábrán.

vizsgálva egy potenciális transzkripció terminátor szakaszt találunk /7. ábra/. A prokarióta terminátorok karakterisztikus vonásai ismerhetők fel: T bázisok egymást követő sorozata, melyet egy hurokképződésre hajlamos, fordított komplementer ismétlődés előz meg. A hurok kevesebb G/C bázispárt tartalmaz, mint ahogy általában jellemző /13/.

Megvizsgáltuk a teljes, 2500 bp hosszúságú Eco RI-Eco RI fragmenten képződő RNS molekulákat. A jelzett ponton igen enyhe terminációt tapasztaltunk. Mivel a kísérletet heterológ rendszerben végeztük /E. coli RNS-polimerázzal, in vitro/, a lehetséges terminátor szekvencia in vivo szerepe bizonytalan.

Transzláció iniciáció

Mai ismereteink szerint a transzláció iniciációjához prokariótákban három dolog szükséges:

1. A mRNS 5' végének néhány bázisra kiterjedő komplementaritása a 16S riboszomális RNS 3' végével /Shine-Dalgarno szekvencia, 15/.
2. Iniciátor kodon /AUG, ritkán GUG/.
3. Megfelelő távköz 1. és 2. között.

A bevezetőben ismertetett kísérletekből tudtuk, hogy a transzláció az Alu I enzim hasítóhelye környezetében kezdődik. A kiválasztott nyitott leolvasási sor elején három, azonos fázisba eső iniciációs kodont találunk /4. ábra, 132., 216., 237. pozíció/. Megvizsgáltuk a lehetséges start-

1404

TAGGTATGACTAAAAATACCATCCATCAATAGGATAGTATTTTTTTTAGTAGG

 A
 C A
 T T
 A A
 C G
 C G
 T A
 A T
 C A
 C G
 A T
 T A
 A T
 A T
 A T
 A T

1404

TAGGTATGACTA TTTAGTAGG

7. ábra. Potenciális transzkripció terminátor szekvencia és egyik lehetséges másodlagos szerkezeti elrendeződése.

A koordináta a 4. ábrának megfelelően van megadva.

kodonokat megelőző DNS-szakaszokat a fenti három szempontból. Mind a Bacillus 16S rRNS, mind az ettől kissé eltérő E. coli 16S rRNS 3' végével kerestünk homológiát. A jellemző értékeket összehasonlítottuk az E. coli, ill. az eddig ismert néhány Bacillus starthely közös vonásaival /8. ábra/ /14/.

Azonnal szembetűnik, hogy az A. iniciátor hely minden követelménynek eleget tesz. A Shine-Dalgarno komplementaritás nagyfokú, a számított szabadenergia különbség az egyes és kettős szálú állapot között 10.4 kcal/mol E. coli-ban, 18.8 kcal/mol Bacillusban. Ezek az értékek beletartoznak abba a tartományba, melyet az E. coli és Bacillus starthelyek szabadenergia-értékei jelölnek ki /14, 16, 17/. A komplementer szakasz és az iniciátor kodon közötti táv-
köz is pontosan megfelel az átlagértékeknek, tehát az A. starthely mind Bacillusban, mind E. coliban képes a transzláció iniciálására.

A B. iniciátor hely kisfokú komplementaritást mutat a Bacillus 16S rRNS 3' végével /3.4 kcal/mol/, az eddig ismert Bacillus adatok szerint ez nem elegendő az iniciáláshoz /14/. Az E. coli 16S rRNS-sel összevetve azonban magasabb szabadenergia-értéket kapunk. A kisebbfokú homológiát igénylő E. coli rendszerben ez elvileg elegendő a transzláció iniciálásához.

A C. iniciátor kodon előtt nem találunk Shine-Dalgarno szekvenciát.

		<u>Távköz</u>	<u>-ΔG /kcal/mol/</u>
	132 ·		
A.	mRNS ..UCGAAAGGGGCAACAACA <u>AUG</u> ..		
	16S rRNS /B.subtilis/ 3'UCUUU <u>CCC</u> ..	7	18.8
	16S rRNS /E. coli/ 3'AUU <u>CCC</u> ..	7	10.4
	216 ·		
B.	mRNS ..GAAGAAGUAAGACAACUAU <u>GAUG</u> ..		
	16S rRNS /B.subtilis/ 3'UCUU <u>UC</u> ..	10	3.4
	16S rRNS /E. coli/ 3'AU <u>UC</u> ..	10	5.2
	237 ·		
C.	mRNS ..AUCAAUGAGGAA <u>AUG</u> ..		
	Bacillus	6-8	16-20
	E. coli	4-14	4-23

8. ábra. Transzláció iniciáció.

A távközt a komplementer szakasz és az iniciátor kodon közötti bázisok száma definiálja. A szabadenergia értékeket - mint a komplementaritás fokának jellemzőjét - Tinoco és mtsai /12/ adatai alapján számítottuk ki.

A szekvenciából levont következtetéseink magyarázatul szolgálnak a bevezetőben ismertetett minisejt kísérletekhez. Az intakt gént hordozó pES2 plazmidról a teljes metiláz molekula szintetizálódik az *E. coli* minisejtben. Ekkor az A. transzlációs starthely működik. Minden bizonnyal ez iniciál B. sphaericusban is. A gélképen /2. ábra/ megjelenik egy halványabb, rövidebb molekulát reprezentáló csík is, ez a B. starthely kevésbé hatékony, de *E. coliban* észlelhető működésének eredménye. A pM10 plazmidszármazék a gén elejét az A. hellyel nem tartalmazza, így a transzláció csak a B. helyen tud indulni, csak a kisebb molekulású fehérje jelenik meg a gélen. Hogy ez a kisebb fehérje megőrzi Bsp RI metiláz aktivitását és specifitását, azt jelzi, hogy az N-terminális 28 aminosav nem szükséges a funkció szempontjából.

A Bsp RI metiláz szekvenciából számított molekulásúlya 48 280 D, a B. helyről induló, kisebb fehérje-molekuláé 3253 D-nal kevesebb. Ezek az adatok - figyelembe véve a molekulású meghatározás hibahatárait, az esetleges poszttranszlációs módosulásokat - jó egyezést mutatnak a mért 50 000-52 000 D molekulásúval ill. 2000 D-os különbséggel. A mért és a számított molekulású megegyezése is arra utal, hogy *in vivo* *Bacillus sphaericus*ban az A. transzlációs starthely funkcionál.

Bázisösszetétel, kodonhasználat

A Bsp RI metiláz gén magas A+T tartalmu. Az ismert szekvenciájú Bacillus gének hasonlóan magas A+T %-ot mutatnak. Érdekesség, hogy - szemben egy átlagos E. coli génnel - az eddig megszekvenciázott egyetlen II. típusu metiláz, az Eco RI metiláz A+T tartalma szintén igen magas.

BLIPEN /18/	55 %	A+T
BSUAMI /19/	58 %	A+T
BSPMET	61 %	A+T
ECOMET /1,2/	68 %	A+T
ECOMIX /2/	48 %	A+T

A magas A+T tartalom a kodonhasználatban is tükröződik /2. táblázat/. A legtöbb esetben a szinonim kodonok 3. pozíciójában előnyben részesül az A vagy U. Hasonló a többi Bacillus gén kodonhasználatára, bár az AU preferencia nem ennyire kifejezett. Feltűnő, hogy az Eco RI metiláz kodonválasztásában is igen sok közös vonást mutat a Bsp RI metilázzal, noha az átlagos E. coli gének kodonhasználatára gyökeresen eltérő. A különbségek és hasonlóságok jobban szembetűnnek az alábbi táblázatban. Feltűntettük, hogy a 29 szinonim kodonpárból /melyek az 1. és 2. pozícióban egyeznek, és a 3. helyen purint vagy pirimidint tartalmaznak/ az egyes esetekben hányszor részesül előnyben az A-ra vagy U-ra, hányszor a G-re vagy C-re végződő, és hányszor egyforma az arányuk.

Kodon	BSPMET	BLIPEN	BSUAMI	ECOMET	ECOMIX
Arg CGU	14	10	8	0	19
CGC	0	3	4	3	17
CGA	12	13	6	3	4
CGG	5	10	2	0	2
AGA	21	7	6	31	2
AGG	2	7	10	3	0
Leu CUU	21	49	13	15	8
CUC	2	10	4	3	8
CUA	14	0	2	15	4
CUG	0	10	21	9	70
UUA	17	26	19	28	10
UUG	14	13	10	15	9
Ser UCU	12	3	23	25	19
UCC	7	3	17	0	13
UCA	0	7	10	9	7
UCG	5	10	19	12	10
AGU	19	16	17	12	5
AGC	2	7	8	12	13
Thr ACU	9	16	4	9	10
ACC	7	10	8	0	23
ACA	9	26	31	15	2
ACG	9	23	15	3	13
Pro CCU	19	10	13	18	4
CCC	2	3	0	0	7
CCA	19	10	4	15	8
CCG	7	16	17	0	19
Ala GCU	17	26	25	12	15
GCC	5	26	17	3	28
GCA	33	42	31	9	22
GCG	14	16	25	6	42

Kodon	BSPMET	BLIPEN	BSUAMI	ECOMET	ECOMIX
Gly GGU	26	16	13	18	32
GGC	12	10	27	9	37
GGA	28	23	25	9	4
GGG	9	3	13	15	5
Val GUU	24	10	10	40	23
GUC	7	10	10	3	13
GUA	17	16	8	9	13
GUG	17	20	21	6	28
Lys AAA	47	62	33	68	40
AAG	24	33	13	40	9
Asn AAU	33	33	56	58	13
AAC	21	23	25	28	25
Gln CAA	28	16	23	12	15
CAG	9	13	19	3	31
His CAU	19	0	21	15	7
CAC	5	3	6	6	7
Glu GAA	66	42	23	31	32
GAG	21	29	19	31	20
Asp GAU	42	62	52	65	25
GAC	17	16	15	6	18
Tyr UAU	26	16	29	49	11
UAC	12	3	8	15	14
Cys UGU	5	0	2	9	6
UGC	2	7	0	12	6
Phe UUU	42	20	25	49	30
UUC	19	10	17	21	22
Ile AUU	40	26	21	43	33
AUC	12	13	19	6	35
AUA	19	7	13	21	1
Met AUG	26	20	17	6	25
Trp UGG	7	13	25	6	6

2. táblázat. Bacillus és E. coli gének kodonhasználata.

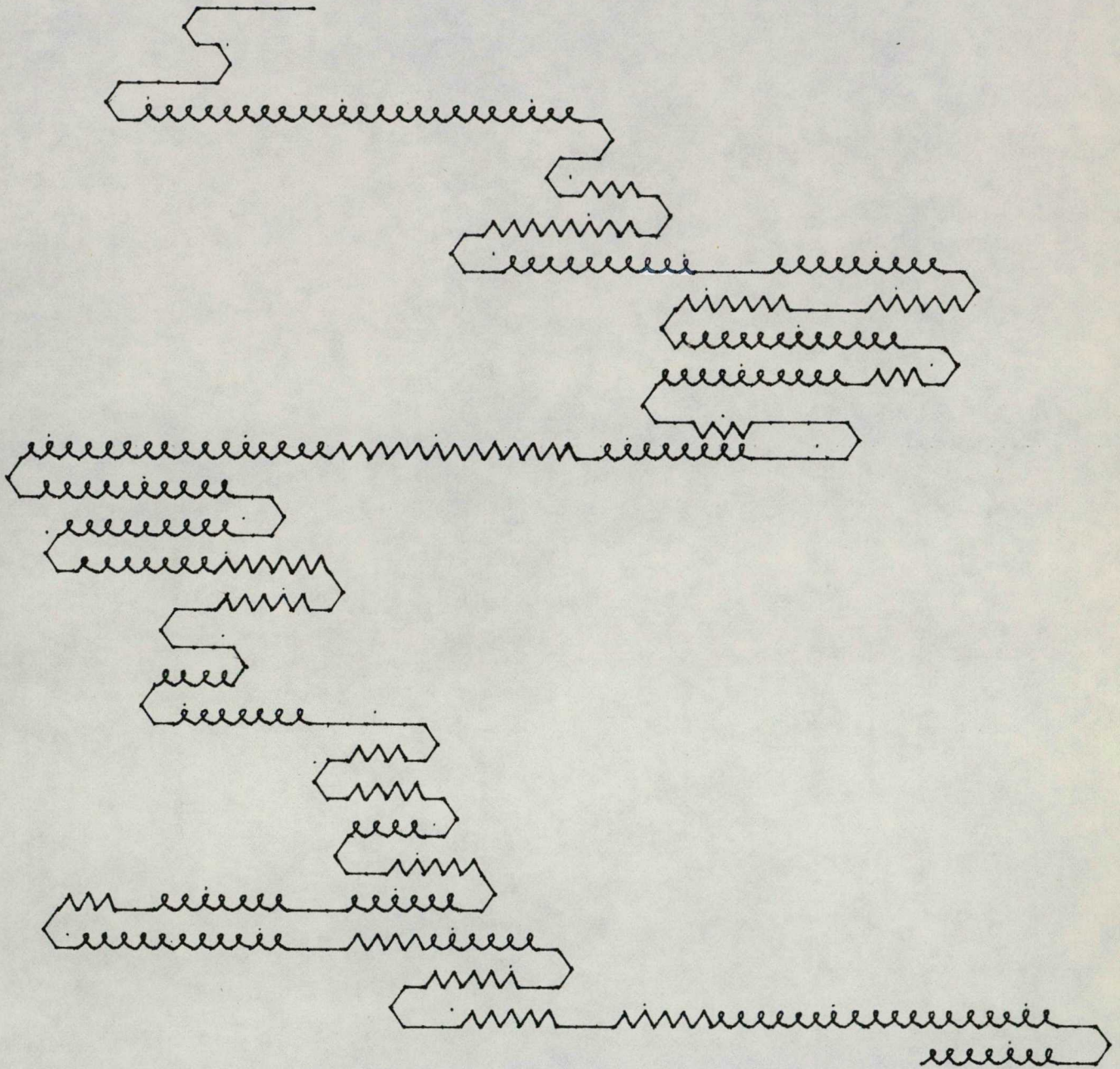
A gyakoriság-értékeket ezrelékben adtuk meg.

	A,U>G,C	A,U=G,C	A,U<G,C
BLIPEN	19	4	6
BSUAMI	21	1	7
BSPMET	26	2	1
ECOMET	23	2	4
ECOMIX	9	2	18

A különbségek a taxonómiai távolságot is érzékel-
tetik /eltekintve az aberráns viselkedésű Eco RI meti-
láztól/. Kimutatták, hogy a Gram⁻ Enterobacteriaceae
család rendszertanilag egymáshoz közel álló tagjainak
kodonhasználata és - amivel ez elsősorban összefügg -
izoakceptor tRNS-eloszlása hasonló /20/. /Az egyes kodo-
nok előfordulási gyakorisága nagy átlagban kifejezi
az izoakceptor tRNS-ek relatív mennyiségét a sejtben/.
A rendelkezésünkre álló néhány adatból is kitűnik, hogy a
Gram⁺ Bacillus genuson belül is a hasonlóságok dominál-
nak. A rendszertanilag egymástól távoli két csoport kodon-
választása és - valószínűleg - izoakceptor tRNS-elosz-
lása viszont gyökeresen eltér, ahogy erre más esetben is
találtak utalást /20, 21/.

A metiláz elsődleges és másodlagos szerkezete

A Bsp RI metiláz szimmetrikus szekvenciát ismer
fel a DNS-en. Kézenfekvő, hogy a molekulában is valami-
lyen szimmetriát keressünk. Megvizsgáltuk a DNS-szekven-



- ⌚ α -helix /42 %/
- ^ β -szerkezet /20 %/
- β -fordulat és egyéb

9. ábra. A másodlagos fehérje-szerkezet modellje.

ciából származtatott aminosav-sorrendet, találunk-e intramolekuláris homológiákat. Homológoknak tekintettünk két szakaszt, melyek a vizsgált hosszon legalább 50 %-ban azonosak, és legalább 3 helyen közös aminosavat tartalmaznak.

Számítógépes adataink között csupán néhány aminosavas egyezéseket találtunk; szembeötlő, szignifikáns homológia nem fedezhető fel a molekulában. A rövidebb sorrend-egyezések jelentőségének elbirálásánál összehasonlítottuk másodlagos szerkezeti környezetüket is.

A fehérje másodlagos szerkezetének modelljét Chou és Fasman predikciós szabályainak segítségével készítettük el /9. ábra/. A módszer azon alapul, hogy bizonyos aminosavak, aminosavcsoportok milyen gyakorisággal fordulnak elő ismert szerkezetű fehérjék különböző szerkezeti elemeiben. A modell mintegy 80 %-os biztonsággal adja meg az α -helixek, β -szerkezetek pozícióját. A másodlagos szerkezetben sem találtunk szembeötlő ismétlődéseket.

A homológia-vizsgálatoknak, a másodlagos szerkezet tanulmányozásának akkor lesz nagyobb jelentősége, mikor a Bsp RI metilázt a két másik, hasonló specifitásu metilázsal is össze tudjuk hasonlítani. A gének nukleotid sorrendjének meghatározása folyamatban van.

ÖSSZEFOGLALÁS

Szomolányi és mtsai *E. coliban* klónozták a *Bacillus sphaericus* kromoszóma 2500 bázispáros szegmensét, melyről kimutatták, hogy az intakt metiláz gént hordozza /3/. Kiss Antal szubklónozási kísérleteivel pontosabban meghatározta a gént a klónozott szakaszon, és megállapította a transzkripció irányát.

A dolgozatban ismertetjük a kérdéses régióban meghatározott mintegy 1600 nukleotid sorrendjét. Egyetlen megfelelő hosszúságu nyitott leolvasási sort találtunk, mely egy 424 aminosavból álló fehérje kódolására képes. A számított és mért molekulatömeg jó egyezést mutat /48 280 ill. 50-52 000/. A szekvencia alapján kikeresett promoter funkcionálását *in vitro* transzkripciós kísérletekkel igazoltuk. A promoter TTGTCA -35-ös régióval és TAAACT Pribnow-boxszal rendelkezik. A Pribnow boxtól disztálisan 36 nukleotid távolságra található a transzlációs starthely. Az iniciátor kodont tipikus Shine-Dalgarno szekvencia - riboszóma-kötőhely - előzi meg /GAAAGGGG/. A szekvenciából levont következtetések segítségével és Erdei Sára korábbi, *E. coli* minisejtekkel végzett transzlációs kísérleteinek felhasználásával kimutattuk, hogy *E. coliban* egy másodlagos transzlációs starthely is képes működni. Mivel a másodlagos fehérjetermék is metiláz aktiv, megállapítottuk, hogy az N-terminális 28 aminosav nem szükséges a funkció szem-

pontjából. A metiláz gén A+T tartalomban /61 %/ és kodonhasználatban hasonlóságokat mutat az eddig ismert Bacillus génekkel, és gyökeresen eltér a rendszertanilag távolabbi E. coli génektől. Megvizsgáltuk a DNS-szekvenciából következtetett aminosav sorrendet és a fehérje másodlagos szerkezetének modelljét, hogy találunk-e belső szimmetriát a molekulában. Számítógépes elemzésünk nem mutatott ki szignifikáns ismétlődéseket.

A specifikus fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatához egy igen alkalmas modellrendszerrel rendelkezünk: három, hasonló szekvencia-specifitású metiláz között szándékozunk összehasonlitásokat tenni klónozott génjeik segítségével. Ebben volt az első lépés a Bsp RI metiláz gén analízise.

Eredményeink bővítik ismereteinket a restrikciós-modifikációs rendszerek enzimeiről, melyek elterjedt laboratóriumi alkalmazásuk ellenére kevésbé ismertek. Eddig egyetlen II. típusú restrikciós endonukleáz és modifikációs metiláz génjének nukleotid sorrendjét közölték.

Míg Gram⁻ baktériumokból bőséges szekvencia-információval rendelkezünk, addig Gram⁺ mikroorganizmusokból csupán néhány strukturgén és transzkripciós, transzlációs szignál szekvenciája ismert. A Bacillus sphaericus metiláz génje az egyik legsokoldalubban jellemzett Gram⁺ gén jelenleg.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Newman, A.K., Rubin, R.A., Kim, S. and Modrich, P.: DNA sequences of structural genes for Eco RI DNA restriction and modification enzymes. J. Biol. Chem. 256 /1981/ 2131-2139
2. Greene, P.J., Gupta, M., Boyer, H.W., Brown, W.E. and Rosenberg, J.M.: Sequence analysis of the DNA encoding the Eco RI endonuclease and methylase. J. Biol. Chem. 256 /1981/ 2143-2155
3. Szomolányi, É., Kiss, A. and Venetianer, P.: Cloning the modification methylase gene of Bacillus sphaericus R in Escherichia coli. Gene 10 /1980/ 219-225
4. Kiss, A. and Baldauf, F.: Molecular cloning and expression in Escherichia coli of two modification methylase genes of Bacillus subtilis. Gene 21 /1983/ 113-121
5. Koncz, C., Kiss, A. and Venetianer, P.: Biochemical characterization of the restriction-modification system of Bacillus sphaericus R. Eur. J. Biochem. 89 /1978/ 523-529
6. Walseth, T.F. and Johnson, R.A.: The enzymatic preparation of $\{\alpha^{32}\text{P}\}$ nucleoside triphosphates, cyclic $\{^{32}\text{P}\}$ AMP and cyclic $\{^{32}\text{P}\}$ GMP. Biochimica et Biophysica Acta, 526 /1979/ 11-31
7. New England Biolabs Catalog 1982-1983

8. Maxam, A.M., and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65 /1980/ 499-560
9. Smith, H.O. and Birnstiel, M.L.: A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucl. Acids Res.* 3 /1976/ 2387-2398
10. Chou, P.Y. and Fasman, G.D.: Prediction of β -turns. *Biophysical J.* 26 /1979/ 367-383
11. Chou, P.Y. and Fasman, G.D.: Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.* 47 /1978/ 45-148
12. Tinoco, I., Borer, P.N., Dengler, B., Levine, M.D., Uhlenbeck, O.C., Crothers, D.M. and Gralla, J.: Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nature New Biol.* 246 /1973/ 40-41
13. Rosenberg, M. and Court, D.: Regulatory sequences involved in the promotion and termination of transcription. *Ann. Rev. Genet.* 13 /1979/ 319-355
14. Moran, C.P., Lang, N., LeGrice, S.F.J., Lee, G., Stephens, M., Sonenshein, A.L., Pero, J. and Losick, R.: Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186 /1982/ 339-346
15. Shine, J. and Dalgarno, L.: The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 /1974/ 1342-1346

16. Gold, L., Pribnow, D., Schneider, T., Shinedling, S., Swebilius Singer, B., and Stormo, G.: Translational initiation in prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 35 /1981/ 365-403
17. Stormo, G., Schneider, T. and Gold, L.: Characterization of translational initiation sites in *E. coli*. *Nucl. Acids Res.* 10 /1982/ 2971-2996
18. Neugebauer, K., Sprengel, R. and Schaller, H.: Penicillinase from *Bacillus licheniformis*: nucleotide sequence of the gene and implications for the biosynthesis of a secretory protein in a Gram-positive bacterium. *Nucl. Acids Res.* 9 /1981/ 2577-2588
19. Yang, M., Galizzi, A. and Henner, D.: Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. *Nucl. Acids Res.* 11 /1983/ 237-249
20. Ikemura, T.: Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes. Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and *Escherichia coli* with reference to the abundance of isoaccepting transfer RNAs. *J. Mol. Biol.* 158 /1982/ 573-597
21. Gouy, M. and Gautier, C.: Codon usage in bacteria: correlation with gene expressivity. *Nucl. Acids Res.* 10 /1982/ 7055-7074
22. Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.: *Molecular cloning /laboratory manual/*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

23. Schäfer, R., Zillig, W. and Zechel, K.: A model for the initiation of transcription by DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 33 /1973/ 207-214

KÖSZÖNETNYILVÁNITÁS

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Antal tudományos munkatársnak a munka előkészítéséért, irányításáért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Erdei Sára tudományos munkatársnak a hasznos tanácsokért, Pósfai János tudományos munkatársnak a számítógépes elemzések gyakorlati megvalósításáért. Köszönöm Dr. Venetianer Pál tudományos főmunkatársnak az eredmények értékelésében nyújtott segítségét, és a lehetőséget, hogy ebben a témában dolgozhattam.