

Virusindukált szekvencia-specifikus endonukleáz
megjelenése az *Anacystis nidulans* kéalgában

Doktori disszertáció

Készítette :

Szekeres Miklós
tudományos munkatárs
Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Növényélettani Intézet

1 9 8 0.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Dr. Tomasz Jenőnek /MTA Szegedi Biológiai Központ, Biofizikai Int./ a bázisanalizishez nyújtott utmutatásaiért, Dr. Simoncsits Andrásnak /MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Int./ tanácsaiért és segítségéért a DNS végjelölés során, és Dr. Sain Bélának /MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Int./ értékes javaslataiért és az érdeklődésért, amellyel munkám alakulását kísérte. Külön szeretnék köszönetet mondani Dr. Farkas Gábornak, az MTA Szegedi Biológiai Központ Növényélettani Intézet igazgatójának sokoldalú segítségéért.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
BEVEZETÉS	1.
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
1.1. A kékalgák (<i>Cyanophyta</i>)	3.
1.1.1. Általános jellemzés	3.
1.1.2. Az <i>Anacystis nidulans</i> jellemzése	5.
1.2. Cianofágok	7.
1.2.1. Általános jellemzés	7.
1.2.2. Az AS-1 cianofág	7.
1.3. Szekvencia-specifikus endonukleázok	9.
1.3.1. Meghatározásuk	9.
1.3.2. Felosztásuk	10.
1.3.3. Funkciójuk	13.
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15.
2.1. Kékalga és cianofág, tenyésztési körülmények	15.
2.2. DNS minták	15.
2.3. A DNS elektroforézise	16.
2.4. A DNS bázis- és nukleotid-analizise	16.
2.5. Enzimaktivitás mérések	16.
2.6. Molekulasuly meghatározása Sephadex G-200 kromatográfiával	17.
2.7. Alegység molekulasuly meghatározása SDS- -poliakrilamid gélelektroforézissel	18.
2.8. A gazda és fág DNS elválasztása	18.
2.9. DNS fragmentumok 5' végálló nukleotidjának meghatározása	19.

	Oldal
2.10. Proteinmennyiség mérése	20.
3. EREDMÉNYEK	21.
3.1. Az enzim tisztítása	21.
3.2. Az enzim molekulaszúlyának és alegység- szerkezetének meghatározása	22.
3.3. Az enzim specifitása	24.
3.4. Optimális reakciókörülmények	30.
3.5. Az enzimaktivitás időbeni változása a fertőzés során	33.
3.6. A gazda DNS lebontódása a fertőzött sejtben	34.
4. MEGVITATÁS	37.
4.1. Bakteriofágok és szekvencia-specifikus endonukleázok	37.
4.2. Az enzim helye a szekvencia-specifikus endonukleázok között	38.
4.3. A szekvencia-felismerés degenráltsága	39.
4.4. Az enzim szerepe a fertőzött sejtben	40.
4.5. Gazda DNS lebontás a T4, illetve T5 fággal fertőzött <i>Escherichia coli</i> -ban	41.
4.6. Szelektív DNS degradáció eukariotákban	42.
5. IRODALOM	43.

BEVEZETÉS

A kékalgák fotoszintetikus apparátusa a magasabbrendű növényekéhez komoly hasonlóságot mutat. Ez a tulajdonságuk magyarázza, hogy ezek az egyszerű prokariota szervezetek az utóbbi években vonzó kísérleti objektummá váltak. Bár a rajtuk végzett kísérletek végső célja a növényi fotoszintézis illetve anyagcsere vizsgálata, ez csak úgy érhető el, ha a modellként felhasznált kékalgákról alapos ismeretek állnak rendelkezésre. Tanulmányozásuk során számos olyan sajátosságuk vált ismertté, amely speciálisan erre az élőlénycsoportra jellemző. Némelyiküket azonban érdekessé teszi, hogy legalább részben más, bonyolultabb szervezetekben is megtalálhatók összetettebb formában, és ezek igen egyszerű, jól vizsgálható analógiáiként értelmezhetők.

Az *Anacystis nidulans* kékalgában vírusfertőzés hatására egy olyan szekvenciaspecifikus endonukleáz jelenik meg, amely a kettősszálu DNS molekulákat meghatározott ponton hasítja. Az enzimet ötszázszorosan tisztítottam és meghatároztam fontosabb biokémiai jellemzőit. Ennek az endonukleáznak az érdekességét az adja, hogy mindezideig más, virulens fágfertőzés hatására megjelenő szekvencia-specifikus DN-áz nem ismert. Ennek megfelelően egyes restriktív endonukleázokhoz való feltűnő hasonlósága mellett néhány sajátos tulajdonsággal rendelkezik.

Kimutattam, hogy az enzim a vírusfertőzés során a gazda DNS lebontásában játszhat szerepet. Ennek az adatnak a jelentőségét az adja, hogy a hasonló endonukleázok szerepéről ezideig jórészt csak spekulatív elképzelések ismertek.

1. I R O D A L M I Á T T E K I N T É S

Dolgozatom tárgya egy a vírusfertőzés hatására megjelenő szekvencia-specifikus endonukleáz jellemzése és az enzim elhelyezése a fertőzési ciklusban, ezen belül a fertőzött kékalga DNS anyagcseréjében. Ennek megfelelően az irodalmi áttekintés határait az szabta meg, hogy a dolgozat ennek alapján megérthető és az eddigi ismeretekkel összevethető legyen.

1.1. A kékalgák /Cyanophyta/

1.1.1. Általános jellemzés

Ma már nemcsak divatos, de egyre inkább megalapozottnak tekinthető az a felfogás, hogy a kékalgáknak a baktériumoktól való merev elválasztása meglehetősen antropocentrikus és a természetes viszonyt kevésbé tükröző nézet. Számos alapvető strukturális és fiziológiai hasonlóság mellett a klasszikus baktérium-fogalom módosulása, a fonalas felépítésű fotoszintetizáló fajok megismerése is indokolttá teszi, hogy ezt a meglehetősen heterogén csoportot a prokariota élőlények - baktériumok - szerves részének tekintik /WOLK, 1973/.

A kékalgák - jórészt morfológiai alapon - öt szekcióba sorolhatók /RIPPKA és mtsai, 1979/. A fajok egy része /I-II. szekció/ szabadon uszó önálló sejtekként fordul elő, nagyjából azonban /III-V. szekció/ fonalas telepeket alkotnak, amelyek gyakran helyhez kötöttek.

A Gram-negatív baktériumokéval azonos felépítésű peptidoglikán sejtfal egy periferiális helyzetű ún. kromatoplazmát és egy centrális nukleoplazmát vesz körül. Előbbinek a fotoszintetikus lamellarendszer, utóbbinak a kromoszóma a domináló eleme.

Agyagcseréjükben a kékalgák néhány lényeges ponton eltérnek valamennyi többi prokariota szervezettől. Kizárólag itt fordul elő az egyébként a magasabbrendű növényekre jellemző két fotokémiai rendszer. /E tekintetben az egyetlen lényeges különbség, hogy a kékalgákban csak az a-klorofill fordul elő./ Fontos egyezés továbbá, hogy a fotoszintetizáló baktériumoktól eltérően a CO_2 redukciójánál a víz a végső elektrondonor, ezért a fotoszintézis során oxigén képződik. Jellegzetes járulékos fotoszintetikus pigmentjei a kékalgáknak /és az eukariota vörösmoszatoknak is/ a fikocianin, az allofikocianin és a fikoeritrin. Ezek az ún. fikobiliproteinekhez tartozó szinanyagok jelentősen kiterjesztik a fotoszintetikusan aktív hullámhossztartományt.

Igen érdekes és kevésbé ismert tulajdonsága egyes kékalgáknak az ún. obligát fotoautotróf viselkedés.



Az ilyen szervezetek nem képesek fény hiányában különböző szénvegyületeket /pl. glukózt, acetátot/ heterotróf módon felhasználni, sőt ezeket sötétben fel sem veszik környezetükből. A jelenség oka feltehetően az, hogy a felvételhez aktiv transzportra van szüksége a sejtnak, és ennek működése sötétben az igen alacsony ATP szint miatt gátolt /STANIER és COHEN-BAZIRE, 1977/.

Egyedülálló egyes fonalas kékalgáknak az a képessége, hogy aerob körülmények között is kötni tudják a molekuláris nitrogént. Nitrogénszegény körülmények hatására a fonalas telepeken egymástól rendszeres távolságokra nitrogénkötésre specializálódott sejtformák, un. heterociszta alakulnak ki. A heterociszta képzés a sejtdifferenciálódás szempontjából is érdekes és intenzíven kutatott jelenség.

A kékalgák kromoszómája feltehetően cirkuláris, mérete átlagosan $2-5 \times 10^9$ dalton, ami azonosnak tekinthető a bakteriális genom nagyságával /HERDMAN és mtsai, 1979/. A vizsgált fajok többségében sikerült plazmidokat is kimutatni, néha 4-6 különböző formát egy-egy adott törzsből.

1.1.2. Az *Anacystis nidulans* jellemzése

Az irodalomban ezen a néven ismert, legáltalánosabban vizsgált törzs /Pasteur Culture Collection 6301 sz./ pontos rendszertani helye és rokonsága zavaros, ezért a kö-

vetkező adatok csak erre a törzsrre vonatkoznak.

A 6301 sz. törzset édesvizi mintából izolálták Texasban. Rendszertanilag a kékalgák I. szekciója /binárisan osztódó egysejtes formák/ *Synechococcus* genusának fajilag nem azonosított alakja /RIPPKA és mtsai, 1979/. Átlagosan $1 \times 3-4 \mu\text{m}$ nagyságu baktériumszerű sejtjei egyikben osztódnak, osztódás után szétválnak, fonalas formát nem képeznek, lebegő életmódot folytatnak.

Melegkedvelő, szaporodásának hőmérsékleti optimuma 30°C körül van. 10°C -on vagy ez alatti hőmérsékleten a sejtek elpusztulnak. / Optimális környezetben a generációs idő kb. 4 óra.

Az *Anacystis* az egyik legjobban tanulmányozott obligát fotoautotróf szervezet. Anyagcseréjének szabályozásában központi szerepet töltenek be a fénytől függő regulációs mechanizmusok. A fotoszintézis intenzitásától függő redox viszonyok szabályozzák például az intermedier anyagcsere egyik kulcsenzimének, a glukóz-6-foszfát dehidrogenáznak az aktivitását /CSÉKE és mtsai, 1980/. Érdekes, a kékalgákra jellemző szabályozási lehetőség, hogy alloszterikus aktivátor /pl. maga a szubsztrát/ hatására egyes enzimek kismértékben önmagukban is aktív monomerjei hiperaktív oligomer komplexekké alakulhatnak /BALOGH és mtsai, 1979; SCHAEFFER és STANIER, 1978/. Az enzimindukció - talán az energiaigényes új fehérjeszintézis miatt - az *Anacystis*ben alárendelt

szerepet játszik. /Indukálhatóak pl. a nitrát redukció enzimeit./

DNS renaturációs kinetikai mérések alapján az *Anacystis* genom mérete mintegy 2×10^9 dalton /HERDMAN és mtsai, 1979/. A sejtek ezenkívül egy $5,3 \times 10^6$ és egy 30×10^6 dalton nagyságu plazmidot is tartalmaznak /LAU és mtsai, 1980/.

1.2. Cianofágok

1.2.1. Általános jellemzés

A kékalgák fágjai kivétel nélkül az un. bináris fágok csoportjába tartoznak: jól elkülöníthető feji és farki részzel rendelkeznek. Valamennyien duplex DNS-t tartalmaznak.

A fertőzési ciklus csak fényben zajlik le. Mivel az új szintézisek energetikai bázisát az aktiv fotoszintézis adja, ezért a fágfertőzés a sejtek fotoszintetikus apparátusát csaknem a lizisig érintetlenül hagyja. Ez lehetőséget ad arra, hogy a fertőzött sejteken a fotoszintézis és energiatermelés alapvető - a fág által ki nem kapcsolt - folyamatait az egészséges sejtekénél jóval egyszerűbb rendszerben vizsgálják.

1.2.2. Az AS-1 cianofág

A fágot édesvizi mintából izolálták Floridában. A virion jellegzetes bakteriofág megjelenésű, 90 nm-es feji és

250 nm-es kontraktilis farki résszel /SAFFERMAN és mtsai, 1972/. Kettősszálu DNS-e elektronmikroszkópos vizsgálatok szerint mintegy $80 \pm 3 \times 10^6$ molekulasúlyu. Jellegzetessége, hogy a DNS szálak egyikén pontosan meghatározott helyeken nickek vannak /saját adatok/. Ilyen jellegű DNS-e csak a T5 fágoknak és néhány közeli rokonának van.

A fág adszorpciója kb. 10 percet vesz igénybe, teljessé csak Na^+ jelenlétében és fényben tehető /CSÉKE és FARKAS, 1979/.

A fertőzés általános lefolyását az AS-1M fágnál irták le /SHERMAN és mtsai, 1976; SHERMAN és PAUW, 1976/. Ez a fág az AS-1-hez morfológiailag és szerológiaiilag igen közel áll /SHERMAN és CONNELLY, 1976/, viszonyuk durván a T2 és T4 fágokéhoz hasonlítható.

Az AS-1M fertőzésnél a lizisidő 7-8 óra volt, a sejtenkénti fághozam 40 körülnek adódott. A fertőzés ideje alatt szintetizálódó fehérjéket három osztályba /korai, középső, késői/ sorolták. A korai fehérjék szerepe pl. a gazda szintéziseinek blokkolása lenne. A gazda DNS lebontását végző DN-ázt ilyen enzimnek tartják. A középső proteinek közé sorolják pl. a fág DNS szintézisében résztvevő enzimeket. A késői géntermékek jórészt a vírus strukturfehérjéi.

A fertőzött sejtek DNS anyagcseréjét triciált nukleotidok segítségével vizsgálták annak alapján, hogy a jelölés milyen mértékben található a triklórecetsavval kicsapható DNS frakcióban. /A gazda és a fág DNS-t így együtt mérték./ Az eredményeket elektronmikroszkópos adataikkal hasonlították össze. Ugy találták, hogy a gazda DNS lebontás

a fertőzés után szinte azonnal megindul, legintenzívebb kb. a 3. órában. A fág DNS szintézise a 3. órában kezdődik, és a lizisig folyik. Méréseik szerint a gazda DNS lebontásakor keletkező nukleotidok tulnyomó része beépül a fág DNS-ébe.

A fágfertőzés az AS-1 fág esetében a fertőzött sejt intermedier anyagcseréjét azonnal "rövidre zárja" /BALOGH és mtsai, 1979/. A fotoszintézis során keletkező glukóz-foszfátok elszívása minimálissá válik, ezek közvetlenül a glukóz-6-foszfát dehidrogenáz aktiválásával megnyitott és nagy áteresztőképességű pentóz-foszfát ciklusba kerülnek. /Ez a reakciót az egészséges sejtben - fényben - teljesen blokkolva van./ Ez azt jelenti, hogy a fertőzött sejt szinte teljes fotoszintetikus kapacitását az új szintézisek energiaigényének fedezésére fordítja. Az egyedüli disszimilációs út, a pentóz-foszfát ciklus fedezi feltehetően az intenzív nukleinsav szintézisek pentóz igényét is.

1.3. Szekvencia-specifikus endonukleázok

1.3.1. Meghatározásuk

Endonukleázoknak azokat a nukleinsavbontó aktivitással rendelkező enzimeket nevezik, amelyek támadási és hasítási helye egy intakt polinukleotid láncon belül van. /Ellentétben az exonukleázokkal, amelyek a polinukleotid lánc végálló nukleotidjaitól kiindulva bontanak./ A DNS-t bontó

un. dezoxi-endonukleázok egy része szempontjából az adott nukleinsav szakasz nukleotidjainak sorrendje indifferens /pl. a DN-áz I esetében/, másik részüknek viszont csak abban az esetben szubsztrátja egy adott DNS darab, ha az egy meghatározott nukleotid-szekvenciát tartalmaz. Ez utóbbiakat tekintik szekvencia-specifikus DN-ázoknak.

1.3.2. Felosztásuk

A szekvencia-specifikus dezoxi-endonukleázok legfontosabb - és legismertebb - képviselői a restrikciós endonukleázok. Az elnevezés eredetileg mikrobiológiailag vizsgálható restrikciós-modifikációs rendszerekben játszott szerepükre utalt, de újabban ettől függetlenül általánosan használttá vált /ROBERTS, 1976/. Valamennyiükben közös, hogy egy rájuk jellemző szekvencia felismerése után a DNS mindkét szálát egymáshoz közeli helyen elhasítják, ezáltal a szubsztrát molekulát feldarabolják. Közös vonásuk továbbá, hogy a restrikciós enzimet termelő sejt DNS-e védve van ettől a fragmentálódástól azáltal, hogy a restrikciós endonukleáz felismerő-szekvenciái meghatározott helyen védve /metilezve/ vannak. Az így maszkírozott felismerőhely az endonukleáznak nem szubsztrátja.

Az un. I. típusba tartozó restrikciós endonukleázok nagy, néhány százezer dalton molekulasúlyu, több különböző alegységből felépülő enzimek. Működésükhöz Mg^{2+} , ATP és S-adenozil-metionin szükséges. Ez a komplex enzim

felelős a szekvenciaspecifikus modifikációs metiláz aktivitásért is. Az Eco K enzim esetében pl. az S-adenozil-metioninnal kialakuló komplex hozzákapcsolódik a DNS-hez, és a felismerőhely modifikáltságától /illetve annak részleges vagy teljes voltától/ függően metilezi vagy ledisszociál róla. A nem modifikált szekvencia felismerésekor kialakuló felismerő-komplex ATP jelenlétében a DNS-en vándorol, és a felismerőhelytől random távolságra hasít /BICKLE és mtsai, 1978/. A keletkező fragmentumok ennek megfelelően nem karakterisztikus méretűek. Az ATP és az S-adenozil-metionin az I típus enzimeinél fontos reguláló tényező, amely minden esetben biztosítja, hogy azoknak a sejt saját DNS-e ne essen áldozatul.

A II. típus enzimeit viszonylag alacsony molekulahelyek /néhányszor 10^4 dalton/, igen gyakran dimerek vagy tetramerek, amelyek azonos alegységekből épülnek fel. Működésükhöz csak Mg^{2+} -ra van szükségük. Ezek az enzimek csak endonukleáz funkciót teljesítenek, a specifikus metilezést külön modifikációs metilázok végzik. Jellemző a II. típusu restrikciós endonukleázokra a site-specifikus hasítás, aminek következtében a reakciótermékek mindig karakterisztikus méretűek.

Főleg nagy gyakorlati alkalmazhatóságuk miatt a II. típusnak igen nagyszámu enzimét ismerik. A II. típusu endonukleázok által felismert szekvenciák igen változatosak, rendszerint 4-6 nukleotidra terjednek ki, néha indifferens nukleotiddal vagy nukleotidokkal megszakítva.

Nagyon gyakori, hogy a felismerőhely jellegzetes szimmetriájú, ún. palindrom szekvencia. Az ezeket felismerő enzimek a felismerő-szekvencián belül hasítanak. Számos esetben a felismerőhely nem palindrom, ilyenkor a vágás helye ezen a szekvencián kívül, attól néhány nukleotidnyi távolságra esik. /Áttekintésük: ROBERTS, 1976; MODRICH, 1979; ROBERTS, 1980/.

Egy III. típusba sorolják a fentiekbe be nem illeszthető Eco P1, Eco P15 és Hin f III enzimeket. Ezek komplexitás tekintetében az I. és II. típus között állnak. A két különböző alegységből felépülő enzim felelős a DNS restrikcióért és modifikációért egyaránt. Az endonukleáz aktivitás csak Mg^{2+} és ATP jelenlétében észlelhető, az S-adenozil-metionin stimuláló hatása. Az Eco P1 és Eco P15 felismerőhelye nem palindrom szekvencia, a hasítási hely ezektől távolabb, mintegy 25 nukleotid távolságban található. A vágás nem site-specifikus, de helye csak néhány nukleotidnyi bizonytalanságot mutat, ezért jól definiált méretű DNS darabok keletkeznek az emésztés során /HADI és mtsai, 1979/.

A restrikciós enzimekkel szembeni védelem leggyakrabban módja a saját DNS specifikus kémiai védelme, a megfelelő pozícióban levő A illetve C metilezése a felismerőhelyen belül. Bakteriofágok DNS-e gyakran nem specifikusan védett: valamelyik DNS alkotó nukleotid teljesen helyettesítődik valamilyen szokatlan vagy szubsztituált formával. Az ilyen DNS nem szubsztrátja a

restrikciós endonukleázoknak. /Pl. a T páros fágok DNS-ében C helyett mindenhol 5-OMe-C fordul elő./ Néhány fág esetében a bejutó DNS kémiaiilag nincs védve, de egyes korai fág-proteinek specifikusan inaktiválják a gazdasejt restrikiós enzimeit. A T7 fág az Eco B és Eco K, a *Bacillus subtilis* Φ 1 fágja a Bam NX enzimmel szemben védett ilyen módon /ROBERTS, 1976; MAKINO és SAITO, 1980/.

1.3.3. Funkciójuk

A restrikiós endonukleázok élettani szerepe ma még csak felületesen ismert. Bizonyos, hogy védik a sejtet idegen /pl. vírus/ DNS behatolásával szemben /ROBERTS, 1976/. Széleskörű elterjedtségük miatt elképzelhető, hogy emellett más feladatot is ellátnak. Az Eco RI enzim esetében pl. leirták /CHANG és COHEN, 1977/, hogy site-specifikus DNS rekombináció létrejöttében is szerepet játszik. Szintén az Eco RI enzimről ismert, hogy a 5' ... GAATTA ... 3' szekvenciánál csak az egyik DNS szálát hasítja /BISHOP, 1978/. Nem ismert, hogy ennek a nick-képző aktivitásnak van-e in vivo valamilyen jelentősége.

A λ és P2 fágok által kódolt, szekvenciaspecifikus DN-áz aktivitással rendelkező enzimek az un. terminázok. Az "érett" λ DNS 12 nukleotid hosszúságu "ragadós végeit" létrehozó termináz a fág feji részét DNS-sel megtöltő enzimkomplex része /BECKER és GOLD, 1978/.

A *Chlamydomonas reinhardi* nevű zöldmoszat - egy eukariota egysejtű - site-specifikus endonukleáza a II. típusba tartozó restriktív enzimekhez sok tekintetben igen hasonló. Ez az enzim a zigótaképzés során lebontja az "apai" eredetű kloroplasztisz DNS-t, míg a korábban intenzíven metileződött "anyai" kloroplaszt genom meggyásával a kloroplasztiszok anyai öröklődését biztosítja /BURTON és mtsai, 1977/.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Kékalga és cianofág, tenyésztési körülmények

Az *Anacystis nidulans* (= *Synechococcus* sp.) PCC 6301 sz. törzsét /RIPPKA és mtsai, 1979/ KRATZ és MYERS féle "C" médiumban /KRATZ és MYERS, 1955/ tenyésztettem 30°C-on, 5% CO₂-tartalmu levegővel buborékoltatva. A tenyészetet 3,6 x 10⁴ mW m⁻² intenzitású fehér fényel világítottam meg. A fertőzéseket AS-1 fággal /SAFFERMAN és mtsai, 1972/ log. fázisban levő kulturákon 5-ös multiplicitással végeztem. A fertőzési ciklus hossza ilyen körülmények között 7,5-8 óra volt.

Az esetleges bakteriális kontamináció ellenőrzésére használt YT táptalaj literenként 10 g bacto-tryptont, 1 g bacto élesztőkivonatot és 5 g NaCl-ot /pH 7,0/ tartalmazott.

2.2. DNS minták

Az AS-1 DNS-t differenciál-centrifugálással tisztított fágból, proteináz K kezelés után végzett fenolos extrakcióval nyertem /KAISER és HOGNESS, 1966/. A λ cI 857 S₇ fágot a GOLDBERG és HOWE /1969/ által leírt módon preparáltam és az AS-1 fágéval azonos módon tisztítottam. Az *Anacystis* DNS-t a FISCHER és LERMAN /1979/ által leírt módszer szerint tisztítottam. A pBR 322

plazmid DNS-t BOROS I-től /MTA Biológiai Központ, Biokémiai Intézet/ kaptam. A DNS koncentrációkat a 260 nm-es abszorpció értékéből kalkuláltam.

2.3. A DNS elektroforézise

A DNS fragmenteket elektroforézissel, 1%-os, 0,6x12 cm méretű csöves agaróz gélen szeparáltam. Az elektroforézis puffer 0,05 M Tris-HCl-t, 0,02 M NaAc-ot és 2 mM EDTA-t tartalmazott /pH 8,0/. A futtatást 5 mA/cső áramerősséggel végeztem. A pBR 322 fragmenteket 15 x 18 cm-es, 3 mm vastag 6%-os poliakrilamid gélen futtattam, azonos pufferben, 80 V feszültséggel. Amint a brómfenolkék marker a gél 2/3-áig vándorolt, a futtatást befejeztem, a géleket etidiumbromiddal festettem, a DNS-t UV-fényben tettem láthatóvá.

2.4. A DNS bázis- és nukleotid-analizise

Az alkalmazott kvalitatív és kvantitatív analiziseket a TOMASZ J. /1973, 1975/ által leírt módon végeztem.

2.5. Enzimaktivitás mérések

Az enzim tisztítása és jellemzése során az enzimaktivitást a szubsztrát DNS-ből származó fragmentek gélelektroforetikus analizisével teszteltem. A 25 µl reakcióelegy



10 mM Tris-HCl-t, 10 mM MgCl₂-ot, 60 mM NaCl-ot és 14 mM β-merkaptoetanolt /pH 7,5/, továbbá 2 μg λ DNS-t tartalmazott. Az enzim hozzáadása után a reakció 37°C-on 30 vagy 60 percig folyt, majd 5 μl 0,2 M EDTA, 50% szaharóz és 0,1% brómfenolkék tartalmu keverék hozzáadásával leállítottam, s a keletkezett fragmenteket a már leirt módon közvetlenül elektroforetikusán analizáltam.

Az enzimaktivitás kvantitatív meghatározása a kezdeti intakt λ DNS fogyásának mérésén alapult. Gélelektroforetikus elválasztás után a gélek fénykép negativjain Zeiss MD 100 típusu mikrodenzitóméterrel mértem az emésztetlen fág DNS-nek megfelelő sáv intenzitását.

Mivel az enzimmel nem sikerült limit emésztést elérni, a restrikciós enzimeknél használthoz hasonló enzimegység nem volt definiálható. Jobb összehasonlítás híján egy egységnek tekintettem azt az enzimmennyiséget, amely optimális körülmények között 37°C-on egy óra alatt 1 μg λ DNS-t annyira lebont, hogy az intakt DNS-nek megfelelő sáv már gélelektroforézissel nem észlelhető.

2.6. Molekulasuly meghatározása Sephadex G-200 kromatográfiával

2,4 x 100 cm-es Sephadex G-200 oszlopot 50 mM Tris-HCl-t és 7 mM β-merkaptoetanolt tartalmazó pufferrel /pH 7,5/ ekvilibráltam. 2 ml foszfocellulóz kromatográfia után kapott enzimfrakciót - amely tartalmazott még 2 mg

torma peroxidázt /Reanal/ és 10 mg citokróm C-t /Reanal/ - felvittem az oszlopra és 20 ml/h folyási sebességgel 3 ml-es frakciókba szedtem. A kizárási térfogat meghatározására blue dextrán 2000-t /Pharmacia/ használtam.

A peroxidáz aktivitást a BRITTON és MAEHLIY /1955/ által leirt guajakolos módszerrel határoztam meg, a citokróm C-t 415 nm-es abszorpciója alapján lokalizáltam. Az endonukleáz aktivitás mérése a fent leirt módon történt.

2.7. Alegység molekulasuly meghatározása SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel

A tisztított enzimet 0,6 x 8 cm-es csövekben, 10%-os poliakrilamid gélen futtattam a WEBER és mtsai /1972/ által leirt módon, 6 órát 8 mA/cső áramerősség mellett. A gélenkénti proteinmennyiség a 280 nm-es abszorpció alapján becsülve kb. 20 µg volt. A protein band-eket coomassie brilliant blue G 250 festéssel tettem láthatóvá. Molekulasuly-markerként tojás lizozimet /NNP Inc./, marha pankreatikus DN-ázt /Worthington/ és marha szérumalbumint /Serva/ használtam. A nativ gélelektroforézist azonos futtatási rendszerben, SDS nélkül végeztem 4°C hőmérsékleten.

2.8. A gazda és fág DNS elválasztása

A DNS-t a fertőzött kulturából óránként vett mintákból

nyertem a gazda DNS kivonására használt, már leirt módszerrel. A fenolos tisztítási lépést itt kihagytam. A kivonatban lévő gazda és fág DNS-t a FISCHER és LERMAN /1979/ által kidolgozott denaturáló gradiens-gél rendszer segítségével választottam el. Korábbi kísérletek tanúsága szerint ez a módszer alkalmas a tisztított alga, illetve AS-1 DNS szeparálására. /A tisztított DNS-eket külön-külön és keverékként futtattam./

Az elválasztáshoz 10 x 10 x 0,3 cm-es, 4% poliakrilamid alapu lap géleket használtam, amelyekben 0-7,0 M karbamid és 0-40% formamid gradiens volt. A futtatást 24 óráig végeztem 60°C-on, 150 V feszültség mellett. Ezután a géleket etidiumbromiddal festettem, majd UV fénynél lefényképeztem. A negativokat a leirt módon mikrodensitóméterrel scanneltem. A DNS mennyiségeket a görbe alatti területekből kalkuláltam.

A gélekben gyorsabban vándorló gazda DNS-nek és a lassabb fág DNS-nek megfelelő csucok élesen elváltak és helyzetük azonos volt a referenciaként használt tisztított gazda és fág DNS pozíciójával.

2.9. DNS fragmentumok 5' végálló nukleotidjának meghatározása

50 µg λ DNS-t a tisztított enzim preparátummal extenzíven emésztettem /10 standard enzimegység/µg DNS, 37°C-on két óra/, a keletkezett fragmenteket bakteriális alkalikus foszfatazzal /Worthington/ a WU és KAISER /1967/ által

leirt módon kezeltem. Az 5' végálló nukleotidokat T4 polinukleotid kináz segítségével, γ -³²P-ATP-vel (spec.akt. 5500 MBq/ μ mol) refoszforiláltam /MAXAM és GILBERT, 1977/. A reakció során megmaradó ATP-t egy 1 x 35 cm-es Sephadex G-50 oszlopon molekulaszűrőssel távolítottam el.

A végjelölt fragmenteket DN-áz I-gyel és kigyómeleg foszfodieszterázzal /mindkettő Worthington/ emésztettem, majd a kapott 5'-nukleotidokat polietilénimin-cellulóz vékonyrétegen /Polygram Cel 300 PEI, Macherey-Nagel Co./ 1 M-os LiCl-dal futtatva választottam szét. Az egyes nukleotidoknak megfelelő foltokat UV abszorpciójuk alapján lehetett lokalizálni. A foltokat 5'-mononukleotid standard-ekkel /P-L Biochemicals/ azonosítottam. Autoradiográfia után a foltokat kivágtam, radioaktivitásukat szcintillációs számlálóval mértem.

2.10. Proteinmennyiség mérése

Az enzimtisztítás során a különböző tisztaságu preparátumok proteintartalmát a PETERSEN és munkatársai /1977/ által leirt módon határoztam meg.

3. E R E D M É N Y E K

3.1. Az enzim tisztítása

Log. fázisban növäő *Anacystis nidulans* tenyészetet AS-1 fággal 5-ös multiplicitással fertőztem, 3,5 óra után a kulturát lecentrifugáltam. Az esetleges baktérium fertőzést YT-agar lemezre kiszélesztett mintával ellenőriztem. A további műveleteket 0-4°C-on végeztem.

Az összegyűjtött sejteket feltáró pufferben /20 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, 14 mM β-merkaptóetanol, pH 8,0/ szuszpendáltam, 10 percig tartó ultrahangozással állandó hűtés mellett feltártam. 60 perc, 100 000 xg-s centrifugálás után a felülusztót NaCl-dal 1 M-ra állítottam be és 2,5 x 100 cm-es BioGel A 0,5-ös oszlopon kromatografáltam. A kombinált aktiv frakciókat PC pufferrel /10 mM K-foszfát, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 7 mM β-merkaptóetanol/ szemben dializáltam.

PC pufferrel ekvilibrált Whatman P11 foszfo cellulóz oszlopon az összes aktivitás megkötődött. A gradiens eluálást 0-1,0 M-os NaCl tartalmu pufferrel végezve, az enzim 0,3 és 0,45 M között jött le. A kombinált aktiv frakciókat közvetlenül egy 1 x 5 cm-es hidroxilapatit oszlopra vive az átfolyóban nem kaptam detektálható aktivitást. Az oszlopot 0,2 M NaCl-ot tartalmazó PC pufferrel mostam, majd 0,2 M NaCl-ot és 7 mM β-merkaptóetanolt tartalmazó, 0,01 - 0,5 M-os, pH 7,5-ös

K-foszfát grádienssel eluáltam. A 0,15-0,2 M között lejött aktiv frakciókat 50% glicerint tartalmazó PC pufferben dializáltam. A kapott enzimpreparátum -20°C -on hónapokig változatlan aktivitásu és tulajdonságu marad.

Az enzimmtisztítási lépéseket a következő táblázat foglalja össze.

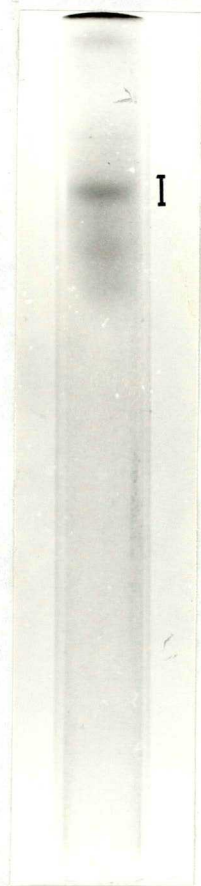
1. Táblázat

Tisztítási lépés	Összes protein (mg)	Összes enzimaktivitás (enzimegység)	Specifikus aktivitás (egység/mg protein)
Nyers kivonat	2 800	101 000	36
Bio-Gel A frakciók	560	89 000	159
Foszfocellulóz frakciók	8,4	23 000	2 738
Hidroxilapatit frakciók	1,2	18 300	15 250

3.2. Az enzim molekulaszúlyának és alegységszerkezetének meghatározása

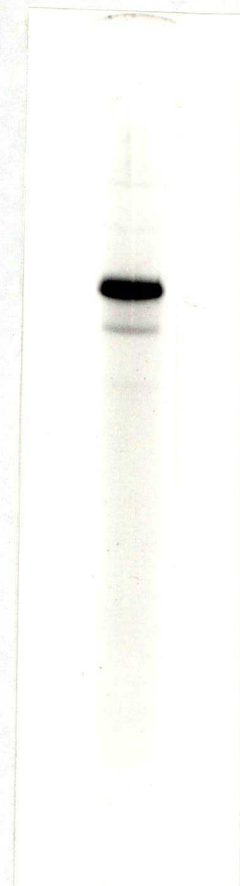
A molekulaszúly közelítő meghatározását Sephadex G-200 gélkromatográfiával végeztem. Az oszlopról lejöő enzimaktivitás egyetlen határozott csucst adott, amely a torna peroxidáznak megfelelő csucsal egybeesett. Ez arra utal, hogy az endonukleáz molekulaszulya 40 000 körül van.

Az enzimpreparátumot mind 10%-os nativ /1. ábra/, mind 10%-os SDS poliakrilamid gélelektroforézissel /2. ábra/ analizálva



1. ábra

A tisztított natív endonukleáz elektroforetogramja poliakrilamid gélen. Az endonukleáz aktivitás a megjelölt /I/ területről nyerhető vissza.



2. ábra

A tisztított endonukleáz elektroforetogramja SDS-poliakrilamid gélen.

egyetlen jelentős protein-komponenst lehetett kimutatni, ami a preparátum nagyfoku tisztaságára utal. Enzimaktivitást a nativ gélen csak a coomassie brilliant blue-val erősen festődő band-ből sikerült kimutatni /1. ábra/.

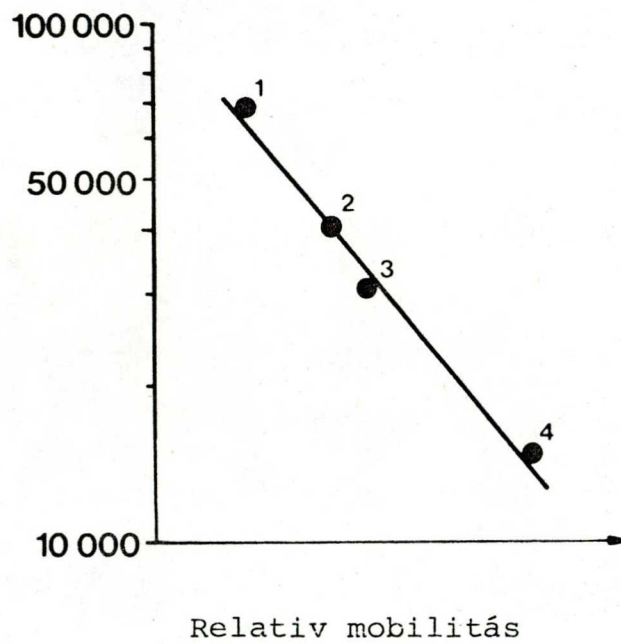
Elektroforetikus mobilitása alapján /3. ábra/ az enzim molekulaszúlya mintegy 40 000-re tehető $\pm 10\%$. A gélszüréssel és az SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel kapott molekulaszúlyok egybeesése erősen valószínűsíti, hogy az enzim egyetlen polipeptid molekula.

3.3. Az enzim specifikitása

Az enzim a szubsztrát DNS-t / λ vagy pBR 322/ karakterisztikus méretű fragmentekre vágja, amelyek gélelektroforetikus analízis során mint különálló band-ek észlelhetők. Ez azt mutatja, hogy az enzim a DNS-en meghatározott szekvenciákat ismer fel és ezeknek megfelelő helyeken hasít.

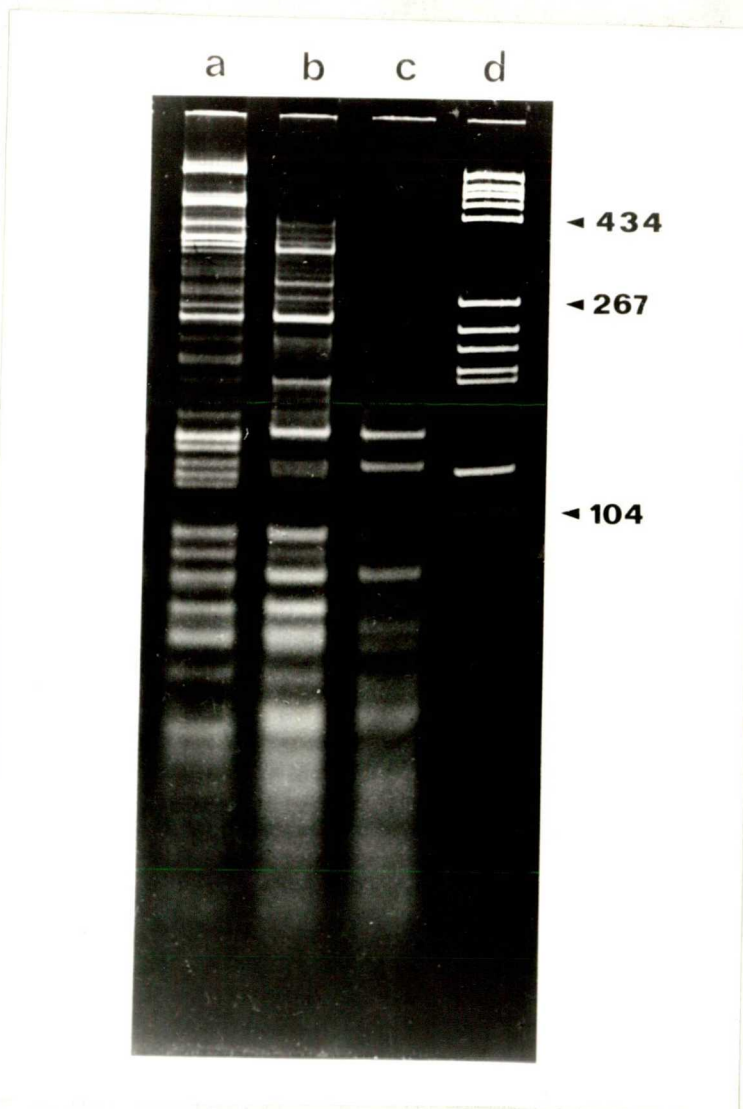
A DNS minták emésztésekor kapott gélelektroforetikus mintázat függ az alkalmazott enzimmennyiségtől. pBR 322 DNS-t növekvő mennyiségű enzimmel emésztve és a kapott fragmenteket elektroforetizálva olyan változó gélképet kaptam, amelyben a nagyobb molekulaszúlyu daraboknak megfelelő band-ek idővel rendre eltűntek, míg a kisebb molekulaszúlyoknak megfelelő régióban új, jól definiált band-ek jelentek meg /4. ábra/.





3. ábra

A fág-indukált endonukleáz molakulasúlyának meghatározása SDS-poliakrilamid gélen. 1: marha szérumalbumin /68 000/, 2: AS-1 endonukleáz, 3: DN-áz I /31 000/, 4: tojás lizozim /14 300/.



4. ábra

A pBR 322 plazmid DNS emésztési képének változása az enzimmennyiség növelésének hatására. 1 μg DNS-t 37°C -on 2 órát inkubáltam 2 /a/, 4 /b/ és 8 /c/ standard enzimegységgel. A jobboldali számok a referenciaként használt DNS-darabok /pBR 322 DNS Bsu I fragmentumai/ nagyságát jelölik bázispárokban megadva.

Ezeknél a kísérleteknél két órás inkubációt alkalmaztam annak demonstrálására, hogy hosszabb inkubációs idő mellett is tovább változik a gélkép az enzim mennyiségének növelésével. A pBR 322 plazmid kis mérete és ismert nukleotid-szekvenciája miatt olyan szubsztrátot jelentett ebben az esetben, amely a λ DNS-hez viszonyítva - kisebb számu képződő fragmentum folytán jól reprodukálható gél-mintázatok bemutatását tette lehetővé.

A standard enzimegységnek /lásd Anyagok és Módszerek/ még mintegy negyvenszerese sem volt elegendő ahhoz, hogy a leirt kísérleti körülmények között limit emésztést adjon.

Az, hogy a reakció során keletkező meghatározott méretű fragmentek reprodukálhatóan kimutathatók, de a reakcióidő vagy az enzim mennyiségének növelésével ezek tovább hasíthatók, arra mutat, hogy az enzim nem csupán egyetlen meghatározott szekvenciát ismer fel, és a különböző "megengedett" szekvenciáknál más-más hatékonysággal hasít.

Arra vonatkozóan, hogy az enzim meghatározott nukleotid-szekvenciáknál hasít /"site-specifikus"/ további bizonyítékot szolgáltatott a keletkező fragmentumok 5' végálló nukleotidjainak analizise. Mivel feltételezhető volt, hogy az enzim esetleg több, egymáshoz csak részben hasonló szekvenciánál is hasít /különböző gyakorisággal/, e szekvenciák lehetséges közös elemének megismerése céljából fontos volt elérni, hogy a vizsgált DNS minél több

lehetséges helyen legyen elvágva. Ezért extrém emésztési körülmények között /nagy enzimfelesleg, hosszú inkubációs idő - lásd Anyagok és Módszerek/ kapott fragmentumokkal végeztem a kísérletet. Mint az 5. ábrán és a 2. táblázatban látható, még ilyen körülmények között is az 5' végálló nukleotidoknak mintegy 70%-a dCMP volt.

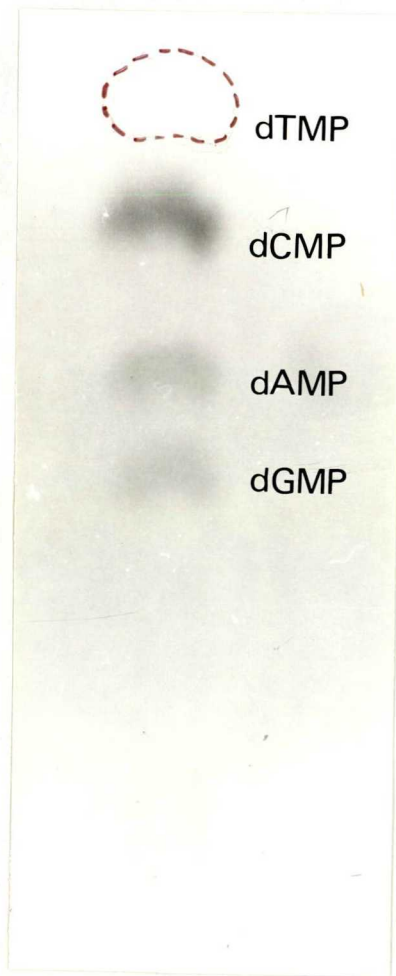
2. Táblázat

A λ DNS szubsztrát emésztése során keletkező fragmentumok 5' végálló nukleotidjainak megoszlása

<u>Nukleotid</u>	<u>Össz. c.p.m.</u>	<u>%</u>
dCMP	15 152	68
dAMP	2 854	13
dGMP	2 654	11
dTMP	1 766	8

Feltételezhető, hogy a 100%-tól való eltérés oka a nagy mennyiségű enzimmel bevitt aspecifikus DN-áz aktivitás lehet. Így, figyelembe véve, hogy a vizsgált körülmények között valamennyi "megengedett" felismerő szekvencia előfordulhat, ez az eredmény arra utal, hogy ezek legtöbbszörnek - esetleg valamennyiének - 5' végálló nukleotidja a dCMP.

A tisztítási lépések /BioGel A 0,5, foszfocellulóz, hidroxilapatit vagy DEAE-cellulóz, Sephadex G-200/ során a különböző tisztaságú preparátumokkal előállítható fragmentum mintázatok reprodukálhatóan azonosak voltak.



5. ábra

AS-1 endonukleázzal emésztett λ DNS fragmentumok 5' végálló nukleotidjai vékonyrétegen szeparálva. A vékonyréteg autoradiogramja.

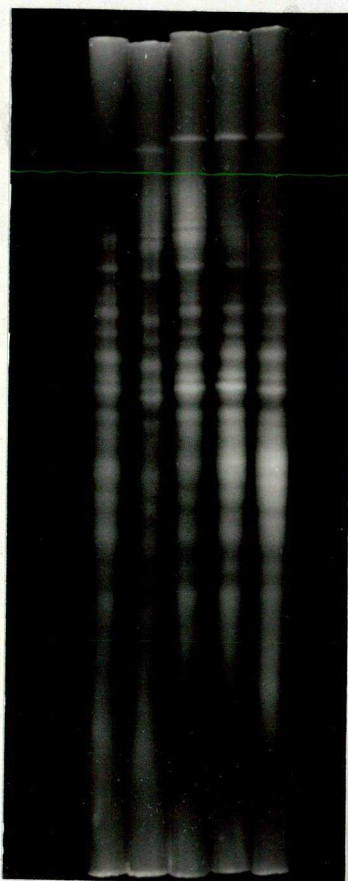
Ez arra utal, hogy kimutatható mennyiségű más szekvencia-specifikus endonukleáz a tisztított enzim-preparátumban nem volt.

Kísérleteim szerint az enzim indukciójáért felelős AS-1 fág DNS-e extenzív emésztési körülmények között is rezisztens az endonukleázzal szemben. A fertőzetlen algából tisztított alga DNS-t viszont a λ DNS bontásával közel azonos sebességgel emésztette az enzim, amint azt az összehasonlítható körülmények között folytatott reakciók során keletkező fragmentek méreteloszlásából becsülni lehet.

3.4. Optimális reakciókörülmények

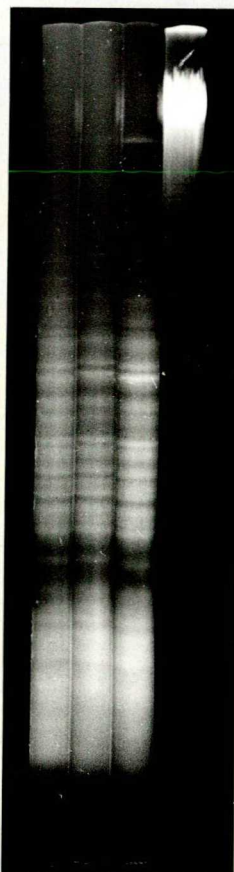
Az enzimaktivitás optimális körülményeinek vizsgálata során rendszeresen teszteltem azokat a paramétereket, amelyekről ismert, hogy egyes restriktív endonukleázok szekvencia-felismerését befolyásolhatják /MALYGUINE és mtsai, 1980/.

A reakció pH függését az 5,0 - 9,0 tartományban vizsgáltam, 0,5 pH egységenként, az optimális ionerősség mellett. A fenti értékek között a pH az enzimreakciót kevésbé befolyásolta /6. ábra/. A reakciósebesség a pH növekedésével körülbelül lineárisan nőtt, pH 9,0-nél a pH 5,0-ön mértnek mintegy duplája volt. Az enzimre jellemző DNS emésztési mintázat változatlan maradt. pH 7,0 és pH 8,0 között /pH optimum/ aspecifikus hasítás nem volt kimutatható.



6. ábra

Az AS-1 endonukleázzal emésztett λ DNS (1 enzimegység/ μ g DNS) elektroforetikus mintázata különböző pH értékeken. /A jobb összehasonlíthatóság kedvéért a reakciósebesség változását az inkubációs idők változtatásával kompenzáltam./ Balról jobbra: pH 5,0 /80 perc/, 6,0 /70 perc/, 7,0 /60 perc/, 8,0 /50 perc/, 9,0 /40 perc/



7. ábra

Az AS-1 endonukleázzal emésztett λ DNS (1 enzimegység/ μ g DNS) elektroforetikus mintázatának változása az ionerősség függvényében, 60 perc inkubálás után. Balról jobbra: 25, 50, 100 és 200 mM - Tris-HCl-lel beállított - ionerősség mellett.

Az ionerősség drasztikusan befolyásolja az enzimaktivitást. 7,5-ös pH mellett, 25 és 500 mM közötti tartományban tesztelve számos ion /pl. K^+ , Na^+ , Mg^{2+} és Tris/ esetében az optimum 100 mM körül volt. 200 mM, illetve ennél magasabb ionerősség az enzimműködést teljesen gátolja, míg 100 mM alatt a reakció lassabbá és kevésbé specifikussá válik /7. ábra/.

Az enzimreakcióhoz csak Mg^{2+} -ra van szükség. Ezt Mn^{2+} -nal helyettesítve, a szekvencia-felismerés erősen romlik, és jórészt aspecifikus DNS degradálódás figyelhető meg.

Mivel a tisztított enzimpreparátum glicerint tartalmazott, külön meggyőződtem arról, hogy az enzim aktivitását, illetve specifitását a reakció során 10%-nyi glicerinnel jelenléte nem befolyásolta.

3.5. Az enzimaktivitás időbeni változása a fertőzés során

A kísérleteket ultrahangozott sejtek 30 000x g-s felüluszójával végeztem. Az enzimaktivitást a fertőzés során óránként vett mintákból a leirt módon határoztam meg. A λ DNS degradálódását alapvetően a vírus-indukált endonukleáznak tulajdonítottam, mert /i/ a fertőzetlen algában az összes DNS-bontó aktivitás olyan alacsony volt, hogy a kísérleteimben használt extraktum-mennyiség 10-szeresével sem okozott tesztrendszeremben kimutatható változást, /ii/ az endonukleáz tisztítása során, a tisztításnál használt assay-körülmények között sem kaptam olyan egyéb DNS-

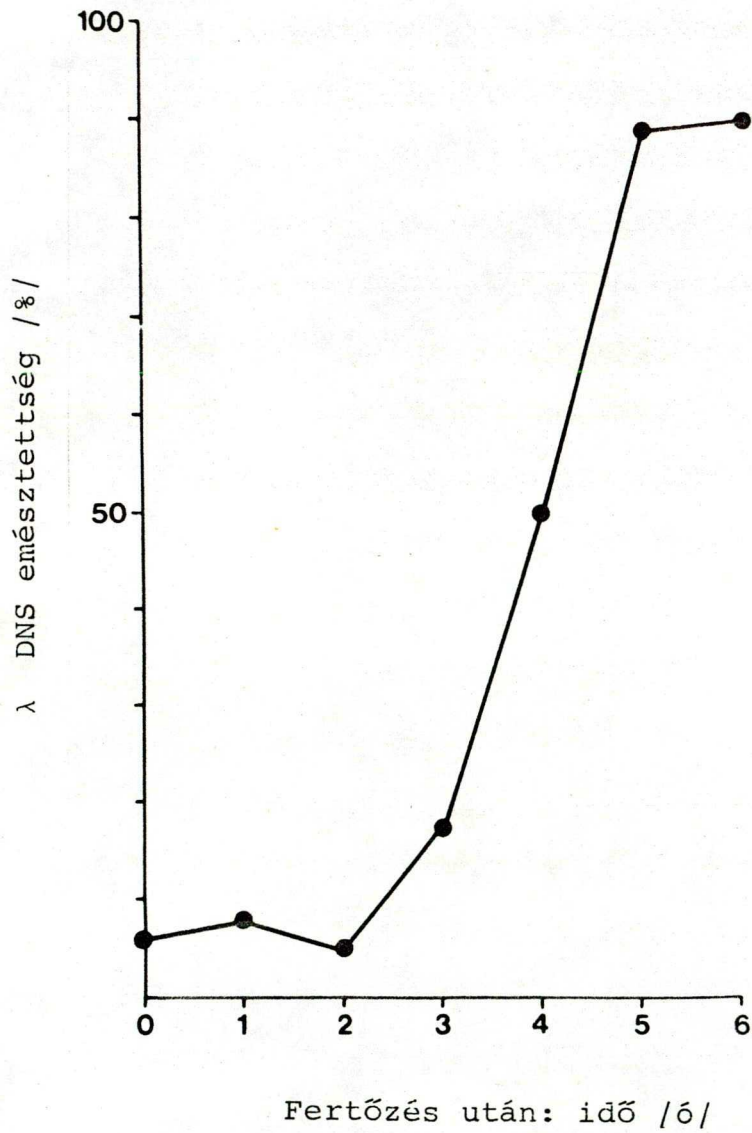


-bontó aktivitást, ami a mérést zavarta volna.

Az enzimaktivitások összehasonlítása a reakció során fogyó intakt λ DNS mennyiségének mérésén alapult. Az adott fertőzési körülmények között, amikor a lizis a 7,5-8. órában következett be, az egységnyi extraktum-térfogatban levő enzimaktivitás hirtelen emelkedését a fertőzés utáni 3. és 4. óra között kaptam /8. ábra/.

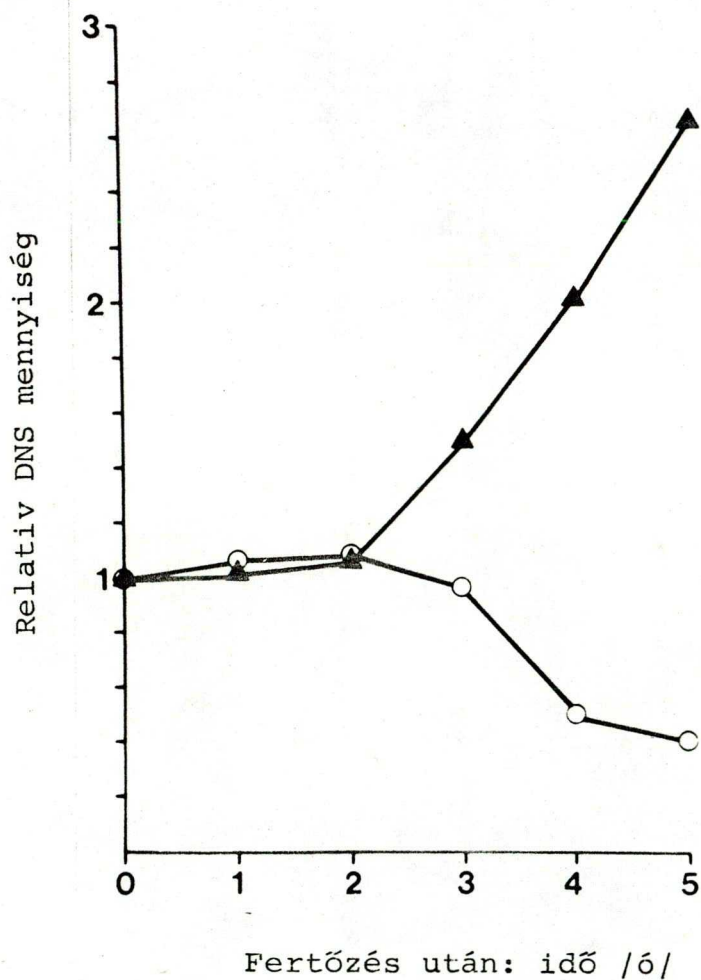
3.6. A gazda DNS lebontódása a fertőzött sejtben

A 9. ábrán látható, hogy a gazda DNS gyors degradálódása a fertőzés 3. és 4. órája között megy végbe. Ez a periódus durván egybeesik az endonukleáz-szint gyors emelkedésével a fertőzött sejtben /8. ábra/.



8. ábra

A fágindukált endonukleáz aktivitásának növekedése a fertőzési ciklus során az AS-1 cianofággal fertőzött *Anacystis*-ben.



9. ábra

A gazda DNS /o/ lebomlása és a fág DNS /▲/ felhalmozódása az AS-1 fág fertőzési ciklusa során. A gazda és a fág DNS mennyiségét a 0 időpontban /a fágadszorpció befejeződésekor/ jelenlévő mennyiségükhöz mint egységhez viszonyítva tüntettem fel.

4. M E G V I T A T Á S

4.1. Bakteriofágok és szekvencia-specifikus endonukleázok

Egy olyan site-specifikus endonukleázt tisztítottam és jellemeztem, amely egy kékalgában fágfertőzés hatására indukálódik. Prokariota szervezetben virulens fertőzés hatására kialakuló ilyen típusu enzimre tudomásom szerint eddig nincs adat. Jóllehet a T5 fág esetében feltételezték, hogy a fertőzéskor indukálódó, a gazda DNS degradálódásáért felelős endonukleáz esetleg szekvencia-specifikus /FIELDING és LUNT, 1969; MCCORQUODALE, 1975/.

Eddig egyetlen fág-kódolt /P1/ szekvencia-specifikus endonukleázt /Eco P1/ írtak le /HABERMANN és mtsai, 1972/. Ez esetben azonban az *Anacystis*-AS-1 rendszerrel szemben lényeges különbséget jelent, hogy az endonukleázt lizogén - tehát alapvetően normális életfunkciókat végző - sejtek termelik, míg az *Anacystis* esetében pusztuló sejtekben jelenik meg.

Mivel az AS-1 indukálta endonukleáz érdekességét jórészt az adja, hogy fágfertőzéskor jelenik meg, fontos annak a bizonyítása, hogy a fertőzetlen sejtekben ilyen aktivitás nincs. Egyrészt erre utal, hogy az egészséges *Anacystis*-ből nem sikerült az enzimet kimutatni. Másrésztől fontos érv emellett az is, hogy az AS-1 DNS-sel el-

lentétben az alga DNS nincs védve az endonukleázzal szemben. /A specifikus védelem hiánya - pl. restrikciós endonukleázok esetében - letális kimenetelű a sejtekre nézve./

4.2. Az enzim helye a szekvencia-specifikus endonukleázok között

Az enzim - a szekvencia-specifikus endonukleázokkal összehasonlítva - viszonylag kis molekulásulya /40 000 dalton/, valamint az alapján, hogy egyetlen polipeptid-láncból áll és aktivitásához csak Mg^{2+} -t igényel, a II. típusu restrikciós endonukleázokhoz áll közel. Hasonló vonás továbbá az is, hogy a saját DNS /itt az AS-1 DNS/ valamilyen módon védett az enzimmel szemben. Feltételezhető, hogy ez a védelem valamilyen szintén szekvencia-specifikus modifikációs rendszertől ered. A védelemnek azt a lehetőségét, hogy a fág DNS-ben valamelyik DNS bázist egy ún. "ritka" bázis teljesen helyettesítene, kizárják azok a kísérletek, amelyekben az AS-1 DNS-t hangyasavval hidrolizálva és a bázisokat a TOMASZ által leírt módon vékonyrétegen elválasztva /TOMASZ, 1973; TOMASZ, 1975/ a módszer érzékenysége mellett csak a négy DNS alapbázist tudtam kimutatni.

Sajátos vonása ugyanakkor a fág-indukált endonukleáznak, hogy nem /vagy esetleg csak szélsőséges körülmények között/ ad limit emésztést, valamint, hogy - ennek megfelelően - több lehetséges nukleotid-szekvenciánál is

hasíthat: szekvencia-felismerése degenerált.

4.3. A szekvencia-felismerés degeneráltsága

Az általam vizsgált körülmények között az enzimmel nem sikerült limit-emésztést elérni. Az enzim e vonatkozásban olyan II. típusu restrikciós enzimekhez /pl. Eco RI, Hin d III/ /POLISKY és mtsai, 1975; HSU és BERG, 1978/ hasonlóan viselkedik, amelyek szekvencia-felismerése kedvezőtlen körülmények között degenerálódik. Néhány ilyen esetben kimutatták /POISKY és mtsai, 1975; HEININGER és mtsai, 1977/, hogy a szuboptimális körülmények hatására ezek az enzimek úgy változnak meg, hogy az eredeti felismerő-szekvenciák szélső nukleotidjai a felismerés szempontjából indifferenssé válnak, és így nemcsak azoknál, hanem azokhoz részben hasonló szekvenciáknál is hasítanak. Az ismert esetekben az ilyen hasítások gyakorisága durván a hasonlóság mértékével arányos. Az enzim affinitása a különböző "megengedett" szekvenciákhoz nagyságrendi eltéréseket is mutathat, ez magyarázza, hogy a limit emésztés /valamennyi potenciális felismerőhely elvágása/ nehezen érhető el. A restrikciós mintázat és az enzimreakció során keletkező fragmentumok 5' végálló nukleotidjai arra utalnak, hogy az AS-1 indukált endonukleáz szekvencia-felismerése hasonló mechanizmust követ.

A II. típusu restrikciós enzimek esetében a leírt jelenség csak szuboptimális körülmények között figyelhető

meg. Az eddig ismert mintegy tíz ilyen esetben ezek a körülmények igen hasonlóak /magas pH, csökkent hidratáltság, Mg^{2+} helyettesítése Mn^{2+} -nal/ /MALYGUINE és mtsai, 1980/. Ezzel szemben a fertőzött *Anacystis nidulans*-ban megjelenő enzim specifitását a pH és a hidratáltság mértéke /ionerősség, illetve glicerinnel jelenléte a reakcióelegyben/ nem befolyásolja.

Hogy az AS-1 indukált enzim *in vivo* körülmények között is a leírt módon hasíthat azzal is alátámasztható, hogy míg a mesterségesen degenerált szekvencia-felismerésű enzimekkel emészthető a velük szemben *in vivo* specifikusan modifikált DNS /POLISKY és mtsai, 1975; HSU és BERG, 1978/, az AS-1 DNS modifikáltsága saját degenerált jellegű endonukleázával szemben teljes védelmet biztosít.

4.4. Az enzim szerepe a fertőzött sejtben

Az eddig ismert restriktív endonukleázok valamennyien szaporodóképes, normális életfunkciókat végző sejtekben termelődnek. Ezzel szemben az AS-1 indukált endonukleáz egy vírusfertőzési folyamat során képződik. Az, hogy az enzim megjelenésétől a sejtek liziséig mindössze négy óra telik el, erősen behatárolja az enzim lehetséges funkcióit. Mivel a fertőzést kiváltó fág DNS-e védett az enzimmel szemben, potenciális szubsztrátnak csak a gazda DNS-e tekinthető. Annak alapján, hogy az enzimaktivitás meredek emelkedése a fertőzés folyamán időben egybeesik a gazda DNS degradálódásával, igen valószínűnek látszik, hogy az

enzim szerepe a gazda DNS szelektív lebontása. Specifitása folytán ezt a funkciót úgy képes elvégezni, hogy az ezzel időben részben átfedő fág DNS szintézissel nem interferál.

4.5. Gazda DNS lebontás a T4, illetve T5 fággal fertőzött *Escherichia coli*-ban

A T4 fág által irányított gazda DNS lebontás mind genetikai, mind biokémiai aspektusból elég részletesen ismert folyamat /KOERNER és SNUSTAD, 1979/. A lebontás iniciációjáért egy olyan endonukleáz /T4 endonukleáz II/ felelős, amely a duplex DNS-en a citozin tartalmu részeken nickeket idéz elő. /Ezek a helyeken kezdődhet meg az exonukleolitikus bontás./ A T4 endonukleáz II nem tekinthető site-specifikusnak, és önmagában nem képes DNS fragmentálódást előidézni. Ugyanakkor figyelemreméltó analógiát jelent az *Anacystis* -AS-1 rendszerrel az, hogy a gazda DNS lebontásában egy olyan endonukleáz játszik kulcsszerepet, amelylyel szemben a fág DNS-e kémiailag védve van. /A T4 fág DNS-e citozin helyett 5-hidroximetil-citozint tartalmaz./

A T5 fág esetében a gazda DNS lebontásának mechanizmusa kevésbé ismert. Bizonyított egy DNS fragmentációt kiváltó endonukleáz szerepe a folyamatban /McCORQUODALE, 1975/. Kimutatták továbbá négy különböző nick-képző szekvencia-specifikus endonukleáz jelenlétét a fertőzött sejtekben /ROGERS és RHOADES, 1976/. /A T5 DNS alapvetően a szokásos négy DNS bázist tartalmazza, ezért itt a szelektív DNS-fel-

ismerésre várhatóan szekvencia-specifikus enzimek alkalmazsak. /

A leirtak alapján elképzelhető egy, a fágfertőzött baktérium gazda DNS lebontását magyarázó, esetleg általánosabban alkalmazható - alapjában a fág DNS kémiai védelmén alapuló modell, amelynek az *Anacystis* - AS-1 rendszer egy igen egyszerű esete.

4.6. Szelektív DNS degradáció eukariotákban

A *Chlamydomonas reinhardi* zöldmoszat ivaros szaporodása során a zigóta két formailag azonos ivarsejtből alakul ki /izogámia/. A zigótaképzés során az egyik ivarsejt kloroplasztiszának genomja megsemmisül, így a kloroplasztiszok "anyai" uton öröklődnek. Sikerült kimutatni /BURTON és mtsai, 1979/, hogy az un. anyai ivarsejtben a zigótaképzés folyamán a kloroplasztisz DNS intenzíven metileződik. Tisztítottak másrésről a zigótákból egy, a restriktív endonukleázokhoz igen hasonló site-specifikus endonukleázt /BURTON és mtsai, 1977/. Ez az enzim végzi az "apai" kloroplasztisz genomjának szelektív lebontását.

Több más eukariota esetében utalnak arra indirekt bizonyítékok, hogy egyes önálló genetikai állománnyal rendelkező sejttorganellek anyai uton való öröklődését /pl. *Pelargonium* kloroplasztiszok, élesztő mitokondriumok/ speciális restriktív-modifikációs rendszer biztosítja /SAGER és KITCHIN, 1975/. Ezek alapján elképzelhető, hogy kémiaiilag megkülönböztethető DNS-ek szelektív endonukleotikus lebontása az élővilágban széleskörben elterjedt regulációs tényező.



5. I R O D A L O M

BALOGH, Á., BORBÉLY, Gy., CSÉKE, Cs., UDVARDY, J.,
FARKAS, G.L. /1979/ Virus infection effects the molecular
properties and activity of glucose-6-P dehydrogenase in
Anacystis nidulans, a cyanobacterium. FEBS Lett. 105,
158-162.

BECKER, A., GOLD, M. /1978/ Enzymatic breakage of the
cohesive end site of phage λ DNA: terminase /ter/
reaktion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4199-4203.

BICKLE, Th.A., BRACK, Ch., YUAN, R. /1978/ ATP-induced
conformational changes in the restriction endonuclease
from *Escherichia coli* K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
75, 3099-3103.

BISHOP, J.O. /1979/ A DNA sequence cleaved by restric-
tion endonuclease R Eco RI in only one strand. J. Mol.
Biol. 128, 545-559.

BRITTON, Ch., MAEHLY, A.C. /1955/ Assay of catalases and
peroxidases. Methods Enzymol. 2, 764-755.

BURTON, W.G., ROBERTS, R.J., MYERS, Ph.A., SAGER, R.
/1977/ A site-specific single-strand endonuclease from
the eukaryote *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA
74, 2687-2691.

BURTON, W.G., GRABOWY, C.T., SAGER, R. /1979/ Role of
methylation in the modification and restriction of
chloroplast DNA in *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 76, 1390-1394.

CHANG, Sh., COHEN, S.N. /1977/ In vivo site-specific
genetic recombination promoted by the Eco RI restriction
endonuclease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4811-4815.

CSÉKE, Cs., FARKAS, G.L. /1979/ Effect of light on the
attachment of cyanophage AS-1 to *Anacystis nidulans*.
J. Bacteriol. 137, 667-669.

CSÉKE, Cs., BALOGH, Á., RUZICKSKA, P., FARKAS, G.L. /1980/
Light-mediated oxido-reductive modulation of glucose-6-
-phosphate dehydrogenase in *Anacystis nidulans*. Proc.
5th Int. Congr. Photosynth., Halkidiki, Greece.

FIELDING, Ph.E., LUNT, M.R. /1969/ A new deoxyribonuclease
activity from bacteria infected with T5 bacteriophage.
FEBS Lett. 5, 214-217.

FISCHER, S.G., LERMAN, L.S. /1979/ Length independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16, 191-200 .

GOLDBERG, A.R., HOWE, M. /1969/ New mutations in the S cistron of bacteriophage lambda affecting host cell lysis. *Virology* 38, 200-202.

HABERMAN, A., HEYWOOD, D.J., MESELSON, M. /1972/ DNA modification methylase activity of *Escherichia coli* restriction endonucleases K and P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3138-3141.

HADI, Sh.M., BACHI, B., SHEPHERD, J.C.W., YUAN, R. /1979/ DNA recognition and cleavage by the Eco P15 restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* 134, 655-666.

HEININGER, K., HÖRZ, W., ZACHAU, H.G. /1977/ Specificity of cleavage by a restriction endonuclease from *Bacillus subtilis*. *Gene* 1, 291-303.

HERDMAN, M., JANVIER, M., RIPPKA, R., STANIER, R.Y. /1979/ Genome size of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 73-85.

HSU, M., BERG, P. /1978/ Altering the specificity of restriction endonuclease: effect of replacing Mg^{2+} with Mn^{2+} . *Biochemistry* 17, 131-138.

KAISER, A.D., HOGNESS, D.S. /1960/ The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage λ dg. J. Mol. Biol. 2, 392-415.

KOERNER, J.F., SNUSTAD, D.P. /1979/ Shutoff of host macromolecular synthesis after T-even bacteriophage infection. Microbiol. Rev. 42, 199-223.

KRATZ, W.A., MYERS, J. /1955/ Nutrition of several blue-green algae. Am.J. Bot. 42, 282-287.

LAU, R.H., SAPIENZA, C., DOOLITTLE, W.F. /1980/ Cyanobacterial plasmids: their widespread occurrence, and the existence of regions of homology between plasmids in the same and different species. Molec. Gen. Genet. 178, 203-211.

MAKINO, O., SAITO, H. /1980/ *Bacillus subtilis*-phage Φ 1 overcomes host-controlled restriction by producing Bam NX inhibitor protein. Molec. Gen. Genet. 179, 463-468.

MALYGUINE, E., VANNIER, P., YOT, P. /1980/ Alteration of the specificity of restriction endonucleases in the presence of organic solvents. Gene 8, 163-177.

REISER, J., YUAN, R. /1977/ Purification and properties of the P15 specific restriction endonuclease from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 252, 451-456.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M.K., STANIER, R.Y. /1979/ Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. 111, 1-61.

ROBERTS, R.J. /1976/ Restriction endonucleases. C.R.C. Crit. Rev. Biochem. 4, 123-164.

ROBERTS, R.J. /1980/ Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. Gene 8, 329-343.

ROGERS, S.G., RHOADES, M. /1976/ Bacteriophage T5-induced endonucleases that introduce site-specific single-chain interruptions in duplex DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1576-1580.

SAFFERMAN, R.S., DIENER, T.O., DESJARDINS, P.R., MORRIS, M.A. /1972/ Isolation and characterization of AS-1- a phycovirus infecting the blue-green algae *Anacystis nidulans* and *Synechococcus cedrorum*. Virology, 47, 105-113.

SAGER, R., KITCHIN, R. /1975/ Selective silencing of eukaryotic DNA. Science 189, 426-433.

SCHAEFFER, F., STANIER, R.Y. /1978/ Glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Anabaena* sp. Arch. Microbiol. 116, 9-19.

SHERMAN, L.A., CONNELLY, M., SHERMAN, D.M. /1976/ Infection of *Synechococcus cedrorum* by the cyanophage AS-1M. I. Ultrastructure of infection and phage assembly. Virology 71, 1-16.

SHERMAN, L.A., CONNELLY, M. /1976/ Isolation and characterization of a cyanophage infecting the unicellular blue-green algae *A.nidulans* and *S.cedrorum*. Virology, 72, 540-544.

SHERMAN, L.A., PAUW, P. /1976/ Infection of *Synechococcus cedrorum* by the cyanophage AS-1M II. Protein and DNA synthesis. Virology 71, 17-27.

STAINER, R.Y., COHEN-BAZIRE, G. /1977/ Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 31, 225-274.

SZEKERES, M. /1981/ Phage-induced development of a site specific endonuclease in *Anacystis nidulans*, a cyanobacterium. Virology /nyomdában/.

TOMASZ, J. /1973/ Separation of nucleic acid bases, nucleosides and nucleotides on Dowex 50 type resin-coated chromatoplates. J. Chromatography 84, 208-213.

TOMASZ, J. /1975/ One-dimensional separation of nine DNA bases on strong cation-exchange thinlayers. Anal. Biochem. 68, 226-229.

WEBER, K., PRINGLE, J.R., OSBORN, M. /1972/ Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. Methods Enzymol. 26, 3-27.

WOLK, C.P. /1973/ Physiology and cytological chemistry of blue-green algae. Bacteriol. Rev. 37, 32-101.

WU, R., KAISER, A.D. /1967/ Mapping the 5'-terminal nucleotides of the bacteriophage λ and related phages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 170-177.

