

Riboszómális RNS szintézis λ rif^d18 DNS-en

Doktori dolgozat

Kiss Ibolya

MTA SzBK Biokémiai Intézete

1977.

B 1390



A dolgozat alapjául szolgáló kísérleteket az MTA SzBK Biokémiai Intézetének Nukleinsav Csoportjában végeztem.

Köszönetemet fejezem ki Dr.Venetianer Pálnak, aki lehetővé tette számomra, hogy a csoportjában dolgozzam és irányította munkámat. Dr.Sümegei Jánosnak és Dr.Udvardy Andornak értékes tanácsaikért, utmutatásukért, valamint a kísérletekben felhasznált RNS-polimeráz preparálásáért ezúton mondok köszönetet. Köszönöm Dr.Sain Béla és Csordás-Tóth Éva munkatársaim baráti segítségét, valamint technikai munkatársaim, Anton Józsefné és Gercsó Katalin lelkiismeretes és szorgalmas munkáját, mely nagy segítséget jelentett kísérleteim elvégzésében.

Munkám elősegítéséért, támogatásáért a csoport egész kollektívájának köszönettel tartozom.

A dolgozat kéziratának átnézéséért és értékes megjegyzéseikért Dr.Dénes Géza akadémikusnak, Dr.Orosz Lászlónak és Dr.Kari Csabának mondok köszönetet.

Rövidítések

- rDNS : a riboszómális RNS-t kódoló gén
- λ rif^d18: λ cI857 S7 drif^d18 rövidített elnevezése
- NTP : ribonukleozid-trifoszfát /ATP, CTP, GTP, UTP/
- tris : tris-/hidroxi-metil/-amino-metán
- SDS : Na-dodecil-szulfát
- EDTA : etilén-diamin-tetra-ecetsav
- TCA : triklór-ecetsav
- PPO : 2,5-difenil-oxazol
- POPOP : 1,4-di-/2- 5-fenil -oxazol/-benzol
- DEP : dietil-pirokarbonát

TARTALOMJEGYZÉK

I.	BEVEZETÉS	1. old.
	1. A transzkripció mechanizmusa	2. "
	2. Az rRNS gén kitüntetett szerepe az in vivo RNS szintézisben	6. "
	3. In vitro rRNS szintézis E. coli DNS-en	8. "
	4. A riboszómális RNS gének szerveződése E. coli DNS-en. Riboszómális RNS gént transzdukáló fágok izolálása	19. "
	5. Célkitűzés	15. "
II.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17. "
III.	AZ EREDMÉNYEK ISMERTETÉSE ÉS MEGVITATÁSA	31. "
	1. In vitro rRNS szintézis λ rif ^d 18 DNS-en	31. "
	2. rRNS szintézis λ rif ^d 18 DNS-en heparin jelenlétében	43. "
	3. rRNS szintézis λ rif ^d 18 DNS-en rifampicin jelenlétében	49. "
	4. rRNS szintézis E. coli DNS-en rifampicin jelenlétében	55. "
IV.	ÖSSZEFOGLALÁS	59. "
V.	IRODALOM	61. "

I. B E V E Z E T É S

E dolgozat tárgya a riboszómális RNS szintézis in vitro tanulmányozása egy *E. coli* riboszómális RNS gént transzdukáló fág λ rif^d18/ DNS-en. A riboszómális RNS szintézis vizsgálatát indokolja a riboszómális RNS gén kitüntetett volta más bakteriális génekhez képest, ugyanis exponenciálisan növekvő baktérium kultúrában olyan intenzív rRNS szintézis történik, mely minden más RNS szintézisét felülmúlja.

Az *E. coli* DNS-en végzett in vitro transzkripciók kísérletek alapján a preferenciális rRNS szintézis magyarázatát az rRNS gén sajátos promoter szerkezetében kereshetjük. Bakteriális DNS-en a gének nagy száma miatt azonban nehéz a jelenség okának vizsgálata. Nagy előre lépést jelentett, hogy az utóbbi években riboszómális RNS gént transzdukáló fágokat izoláltak, melyek felhasználása megkönnyíti a kedvezményezett rRNS szintézis okának kutatását. A λ rif^d18 DNS-en végzett in vitro transzkripciók kísérleteink célja az volt, hogy közelebb jussunk e probléma megértéséhez.

Ahhoz, hogy az ezen kísérletek kapcsán felmerülő problémákat megértsük, a preferenciális in vivo és in vitro rRNS szintézist bizonyító irodalmi eredmények mellett át kell tekintenünk az RNS szintézis mechanizmusára vonatkozó legfontosabb ismereteket, továbbá az rRNS gének felépítésére, elhelyezkedésére és az rRNS géneket transzdukáló fágok izolálására, szerkezetére vonatkozó legújabb irodalmi adatokat.

1. A transzkripció mechanizmusa

E. coli DNS-en valamennyi RNS szintézisét egyetlen enzim, a DNS-függő RNS-polimeráz végzi. Molekulasúlya 470 000 dalton, un. core enzimből és egy könnyen disszociáló σ faktorból áll /1, 2/. A core enzim részei: két α alegység /40 000 dalton/,
egy β " /155 000 " /,
egy β' " /165 000 " /.

A core enzim a σ faktoral /95 000 dalton/ holoenzimet képez.

A transzkripció folyamata négy fő lépésre bontható:

1. Az RNS-polimeráz /továbbiakban polimeráz/ kötődése a templáthoz;
2. RNS-lánc iniciáció;
3. RNS-lánc elongáció;
4. RNS-lánc termináció.

A polimeráz molekula templáthoz kötődésében a β' alegység /3, 4/ az RNS-lánc iniciációban és az elongációban a β alegység /5/, a promoter régió felismerésében pedig a σ faktor vesz részt /6, 7/.

A transzkripció kezdeti lépéseit Chamberlin és mtai vizsgálták részletesen T7 DNS-en in vitro körülmények között /7-15/.

Az RNS-polimeráz kötődése a templáthoz:

A polimeráz templáthoz kötődése időben viszonylag hosszú folyamat / $t_{1/2} = 20-30$ sec T7 DNS-en/, mely sok regulációs lépésre ad lehetőséget. A core enzim mindegyik DNS régióhoz relative nagy affinitással kötődik / $K_{assz.} = 2 \times 10^{11} M^{-1}$ T7 DNS-en/, így nem képes specifikus RNS-lánc iniciációra. A promoter régió

felismeréséhez és specifikus RNS-lánc iniciációhoz a σ faktor jelenléte szükséges. A holoenzim ugyanis amellet, hogy gyengén bármely DNS régióhoz kötődni tud $/K_{\text{assz.}} = 10^8 - 10^9 \text{ M}^{-1}/$, a promoter helyen nagy stabilitású polimeráz-DNS komplex kialakítására képes $/K_{\text{assz.}} = 10^{12} - 10^{14} \text{ M}^{-1}/$ /9/. A σ faktor valószínűleg más polimeráz alegységekre hatva vesz részt a promoter szakasz felismerésében, mert önmagában kis affinitással rendelkezik a DNS-hez /16/.

A DNS-hez kötődés asszociációs-disszociációs lépésekből álló szelekciós folyamattal kezdődik, melynek eredményeképpen a polimeráz - az aspecifikus kötődési helyekről ledisszociálva - eljut a promoter régióba, és a specifikus promoter szekvencia felismerése után egy ún. zárt polimeráz-promoter komplexet hoz létre, mely egy konformáció-változással átalakul gyors RNS-lánc iniciációra képes ún. nyitott polimeráz-promoter komplexszé /13-15/. Ezen átmenet során a DNS-hélix feltehetőleg egy 7-8 bázispárnyi szakaszon felnyílik /14, 82/. A konformáció-változás csak alacsony ionerősségnél és meghatározott, az adott promoterre jellemző hőmérséklet felett történik meg, bár a DNS-hez való kötődés kialakul alacsony hőmérsékleten és magas ionerősségnél is /13, 14, 15/.

Kimutatták, hogy a promoter régió felismerésében a DNS-hélix kis vájatóba eső bázis oldalláncoknak van szerepe /15/.

Az *in vitro* körülmények között, optimális hőmérsékleten és ionerősségnél létrehozott polimeráz-RNS komplexek stabilitása nem egyforma. Vannak igen nagy stabilitású holoenzim-DNS komplexek, melyek disszociációja 37 C° -on igen lassu $/t_{1/2} = 50 \text{ óra}$

T7 DNS-en/, azonban ez nem érvényes a polimeráz-DNS komplexek többségére.

Az ionerősség növelésével a polimeráz-DNS komplexek nagy része disszociációt szenved, és csak igen kis hányaduk marad meg magas sókoncentrációnál /13/. Azokat a polimeráz-DNS komplexeket, melyek még 0,5 M KCl vagy 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ koncentrációnál sem disszociálnak, önkényesen sórezisztensnek szoktuk nevezni.

A polimeráz-DNS komplexek jelentős része érzékeny poli-anionos inhibitorokkal szemben. Így pl. poli/rI/, heparin nagy affinitásuk révén képesek elvonni a polimeráz molekulákat a polimeráz-DNS komplexek jelentős hányadából, míg a hosszú féletidejű promoter-polimeráz komplexek rezisztensek heparin ill. poli/rI/ hatásával szemben /7, 17, 18/. Ezen mechanizmus révén a heparin jelenléte meggátolja az aspecifikus helyekről /nem promoter régiókról/ kezdődő RNS szintézist, s mivel a szabad polimeráz molekulákat a heparin igen gyorsan inaktiválja, megakadályozva ezzel visszakötődésüket a DNS-re, így csak a szintetizálódó RNS-láncok elongációja fejeződhet be, de reiniciáció nem történhet. A heparin pontos hatásmódja azonban nem ismert, és nem tudjuk azt sem, hogy valamennyi promoter-polimeráz komplex rezisztens-e heparinnal szemben. A kísérletek alapján úgy tűnik, hogy a promoter-polimeráz komplexek egy része is heparin és poli/rI/ érzékeny /6/.

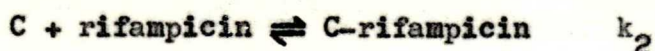
RNS-lánc iniciáció:

Csak a nyitott polimeráz-promoter komplex képes azonnali

RNS-lánc iniciációra. Igen gyors folyamat, látszólagos elsőrendű sebességi konstansa T7 DNS-en, 0,4 mM NTP koncentrációnál 3 sec^{-1} , $t_{1/2} = 0,23 \text{ sec}$ /12/. Az enzim nem igazi katalizátorként, hanem szubsztrátként szerepel a folyamatban. A szubsztrát szempontjából formailag ez egy irreverzibilis másodrendű reakció. A polimeráz molekulán két kötőhely van a purin- és csak egy a pirimidin-ribonukleozid-trifoszfátok számára, az iniciációs helyre ugyanis csak purin-ribonukleozid-trifoszfátok kötődhetnek. Az RNS-lánc iniciáció az 5'-terminális ribonukleozid-trifoszfát /ATP vagy GTP/ enzimhez kötődésével kezdődik, ez a folyamat sebességmeghatározó lépése. Az iniciáció az első internukleotid kötés kialakulásával és σ faktor disszociációjával fejeződik be.

Az iniciáció folyamatát Mangel és mtsai vizsgálták behatóan in vitro rifampicin antibiotikum alkalmazásával /12-14/. A rifampicin mind a szabad RNS-polimerázt, mind a polimeráz-DNS komplexet megtámadja egy másodrendű reakcióban /19/, de az utóbbi reakció sebessége századrésze az előbbiének /10/. A rifampicin csak az iniciációt gátolja, az első foszfodiészter kötés kialakulása után az elongáció már nem érzékeny a drogra /20/. Ha az in vitro RNS szintézist rifampicin és ribonukleozid-trifoszfátok együttes adásával indítjuk, a nyitott promoter-polimeráz komplexek azáltal, hogy igen gyors RNS-lánc iniciációra képesek, látszólag rifampicin rezisztenciát mutatnak. Két vetélkedő reakció játszódik le egyidejűleg /12, 15/:

1. a DNS-polimeráz komplexek inaktivációja k_2 sebességi konstanssal,



2. rifampicin rezisztens RNS-lánc iniciáció k^* sebességi konstanssal,



ahol k^* egyenesen arányos az 5'-terminális ribonukleozid-trifoszfát koncentrációval egészen 1 mM-ig, míg a másik három NTP koncentrációtól független 1 μM alsó értékig; k^* nem változik lényegesen különböző templátok esetén sem /15/.

RNS-lánc elongáció:

Az enzim az RNS-lánc elongációban katalizátorként szerepel. A folyamat ping-pong mechanizmussal játszódik le, melynek során újabb és újabb ribonukleotidok épülnek be az RNS-láncba a templát bázissorendjének megfelelően.

RNS-lánc termináció:

A terminátor helyen a polimeráz molekula vagy magától vagy ún. terminációs faktorok /pl. ρ / hatására ledisszociál, és a komplex RNS-re, DNS-re és core polimerázra esik szét.

Regulációs lépések a transzkripció folyamatán belül a templáthoz való kötődést, az RNS-lánc iniciációt és terminációt befolyásolhatják.

2. Az rRNS gén kitüntetett szerepe az in vivo

RNS szintézisben

A riboszómák a fehérjeszintézis helyei mind prokaryota,

mind eukaryota sejtekben. A prokaryota riboszómák 70 S üledési állandóju részecskék, melyek fehérjéből és RNS-ből állnak. Két alegységre disszociálhatók, melyek közül a 30 S alegység 21-féle fehérjét és egy 16 üledési állandóju rRNS-t tartalmaz, míg a nagyobb, 50 S alegység 34-féle fehérje komponensből, továbbá 23 S és 5 S üledési állandóju rRNS-ből áll.

A baktériumok riboszóma szintézise a sejtnövekedéssel igen szorosan összefügg /21/. Optimális növekedési feltétel esetén logaritmikusan osztódó baktérium sejtben a sejt tömegének 40-50 %-át riboszómák alkotják, biztosítva a gyorsan növekedő kultúra fehérje-szükségletének kielégítését. Ez a nagyarányu riboszóma szintézis igen intenzív riboszómális RNS szintézist tételez fel. A vizsgálatok azt bizonyítják, hogy logaritmikusan szaporodó *E. coli* sejtben optimális növekedési rátánál a szintetizálódott RNS több mint 50 %-a rRNS /22/, amely a genomnak csak mintegy 0,6-0,8 %-át kitevő 6 riboszómális RNS génen /rDNS/ /23, 24/ termelődik.

A rDNS-en tehát rendkívül intenzív transzkripciónak kell végbemennie, lényegesen intenzívebbnek, mint más bakteriális géneken. /A riboszóma fehérjéket kódoló géneken sem történik ilyen nagymérvű RNS szintézis, hiszen a mRNS-ek esetében a transláció során lehetőség van arra, hogy egy RNS kópiáról sok fehérje-lánc szintetizálódjék./ Mivel a baktériumokban valamennyi RNS szintézisét ugyanaz az RNS-polimeráz végzi, ez nem lehet az eltérő mértékű RNS szintézis oka. Így a preferenciális rRNS szintézisnek elméletileg kétféle magyarázata lehet: vagy valamely pozitív regulációs faktor játszik szerepet a folyamat-

ban, vagy pedig az rRNS gén promotere olyan különleges szerkezetű, mely nagy sebességű vagy nagy gyakoriságú RNS-lánc iniciációt eredményez.

A pozitív regulációs faktor keresésére irányuló kísérletek eddig /25/ nem jártak eredménnyel, és - mint azt a következő fejezetben látni fogjuk - in vitro minden külső faktor hozzáadása nélkül is preferenciális rRNS szintézist lehetett kimutatni. Továbbá nem találtak lényeges különbséget az rRNS és más RNS-láncok iniciációjának /15/, valamint elongációjának sebességében sem /26/. Így az intenzív rRNS szintézis legvalószínűbb magyarázata egy igen gyakori rRNS-lánc iniciációt eredményező promoter struktúra. Nagy frekvenciájú rRNS-lánc iniciáció mellett szólnak azok az in vivo megfigyelések, melyek szerint exponenciális növekedés esetén a riboszómális RNS-gének szinte a fizikai telíthetőség határáig telítve vannak polimeráz molekulákkal / = 100 polimeráz molekula/rDNS/ /27, 28/.

3. In vitro rRNS szintézis E. coli DNS-en

Az rRNS szintézis preferenciális volta megmutatkozik az in vitro kísérletekben is. E. coli polimerázzal nyert in vitro transzkriptum kb. 10 %-a rRNS /29-31/, ami - figyelembe véve, hogy az rDNS-ek a templátnak csak mindössze 0,6-0,8 %-át foglalják el - egyértelműen azt igazolja, hogy az rDNS a többi génhez képest kedvezményezetten nyilvánul meg az in vitro transzkripció során.

Kimutatták továbbá, hogy az rRNS gén promotere a vi-

szonylag kis számban előforduló nagy stabilitású *E. coli* promoterek közé tartozik, ugyanis magas ionerősségnél nem disszociál le és heparinnal szemben rezisztens /32, 33/. Sümegi és mtsai kísérletei /33/ azt bizonyítják, hogy az rDNS transzkripciója heparin jelenlétében is preferenciális, mivel a szintetizált rRNS megfelelő polimeráz/DNS aránynál a transzkriptumnak 20-25 %-át teszi ki, és telítési polimeráz koncentrációnál az rDNS 4-5-ször átíródik. Mivel a heparin jelenléte megakadályozza az egyszer már ledisszociált polimeráz molekulák reiniciációba lépését, így az rRNS gének 4-5-szörös átírása azt jelenti, hogy génenként 4-5 polimeráz molekula volt heparin rezisztens komplexben kötve az rDNS promoterén.

Ennek a kísérleti eredménynek egyik lehetséges magyarázata az, hogy az rRNS gének promoterei heparin rezisztens polimeráz tároló helyekkel rendelkeznek, melyek száma génenként 4-5, és innen disszociáció nélkül jutnak el a polimeráz molekulák egymást követve az rRNS szintézis start pontjáig, s kezdik meg az RNS-láncok szintézisét.

Másik lehetséges magyarázat az, hogy minden rDNS-en több promoter van egymás mellett, külön-külön rRNS szintézis start ponttal, így ugyanazon a génen egyidejűleg több rRNS-lánc szintézise kezdődhet meg, melyek hosszúsága csak néhány nukleotidban különbözik egymástól.

Transzkripciós kísérletek tanúsága szerint az rDNS promoteréhez heparin rezisztensen kötött polimeráz molekulák közül egy magas sókoncentrációval szemben is rezisztens kötődik /33/.

Az *E. coli* DNS-en végzett *in vitro* kísérletek tehát azt mutatják, hogy a preferenciális rRNS szintézis magyarázatát az rDNS promoter szerkezetében kell keresni.

4. A riboszómális RNS gének szerveződése *E. coli* DNS-en.
Riboszómális RNS gént transzdukáló fágok izolálása

Az rDNS térképezése nagyon nehéz, részben, mert létfontosságú, másrészt mert több példányban előforduló /24/ génről van szó. Ez az oka annak, hogy az rRNS gének elhelyezkedését az *E. coli* kromoszómán még ma sem ismerjük teljes pontossággal.

Hibridizációs kísérletek alapján úgy tűnik, hogy azonos számú /4-10/ gén van a 16 S, a 23 S és valószínűleg az 5 S rRNS számára is /23, 34, 35/. Jelenleg az a feltételezés látszik legvalószínűbbnek, hogy mindegyik gén 6 példányban fordul elő /36-37/.

Rifampicines gátlás utáni rRNS szintézis vizsgálatával /38-40/, stringent sejtekben az aminosav éhezést követő rRNS szintézis reiniciációjának tanulmányozásával /41/, továbbá hibridizációs kísérletekkel /42, 43/ bizonyították, hogy baktériumokban az rRNS gének a háromféle rRNS génből álló transzkripció egységekben szerveződnek, melyek génsorrendje 16 S - 23 S - 5 S. Elektronmikroszkópos megfigyelések összhangban vannak ezekkel az eredményekkel /44, 45/.

A riboszómális gének többsége a bakteriális kromoszóma replikációs start pontja /74./ körül csoportosul /46-48/, Kaplan és mtsai azonban rRNS géneket találtak az *E. coli* kromoszóma



55-59.^o régiójában is /49/.

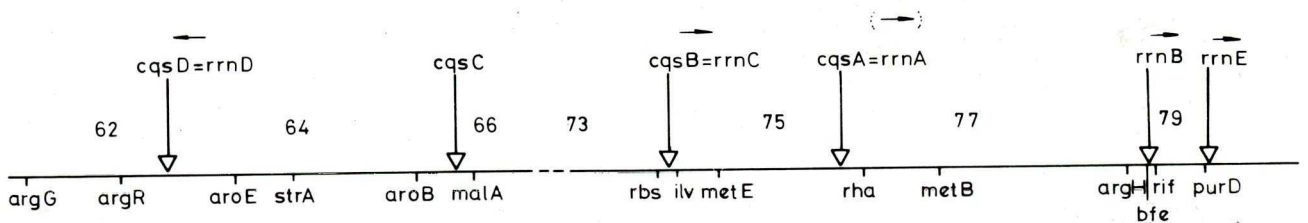
Az 5 S rRNS bázissorrendjében megfigyelhető mikroheterogenitás felhasználásával Jarry és Rosset térképezték az 5 S rRNS géneket *E. coli* DNS-en /50-51/ /1. ábra/. Három 5 S rRNS gént /cqsB, cqsC és cqsD/ sikerült lokalizálniuk az MRE 600 géntérképen a 74.^o, a 66.^o, valamint a 63.^o régióban és egyet /cqsA/ a K 12 géntérkép 75-76.^o régiójában. Nincs kísérleti bizonyíték arra, hogy mind a négy lokusz megtalálható mindkét törzsben, bár legujabb eredményeik azt látszanak igazolni, hogy a cqsB gén is megtalálható a K 12 törzsben /52/. Ugyancsak törzs specifikus oligomerek felhasználásával mutatták ki Matsubara és mtsai, hogy *E. coli* K 12 törzsben a metB régió környékén két 16 S rRNS gén található /53/.

Az utóbbi években egyértelműen igazolódott, hogy a háromféle rRNS gén egyetlen transzkripciós egységet alkot. RN-áz III⁻ *E. coli* mutánsból /54/ ugyanis sikerült izolálni egy 30 S RNS-t /55, 56/, mely a 16 S, 23 S és 5 S rRNS közös prekurzorának bizonyult /57/.

Az utóbbi évek másik jelentős eredménye ezen a területen az, hogy izoláltak olyan transzdukáló fágokat és plazmidokat, melyek más bakteriális gének mellett riboszómális RNS gént is transzdukáltak. E fágok és plazmidok által hordozott bakteriális gének génsorrendjének meghatározása részben igazolni, részben kiegészíteni látszik a korábbi térképezési eredményeket, továbbá az rRNS gének szerkezetének pontos feltárását teszi lehetővé.

Deonier és mtsai elektronmikroszkópos vizsgálatokkal iga-

zolták, hogy az F^{'14} epizómán két rRNS génkészlet /rrnA és rrnB/ található, melyek spacer régiója különböző /58/ és egyikük megfelel cqsA-nak. Az rrnB gént a $\Phi 80d_3$ ilv⁺su⁺7 transzdukáló fág is hordozza /59/ ilv gének és tRNS gén szomszédságában. E fág bakteriális eredetű génjei az F^{'14} plazmidról származnak.



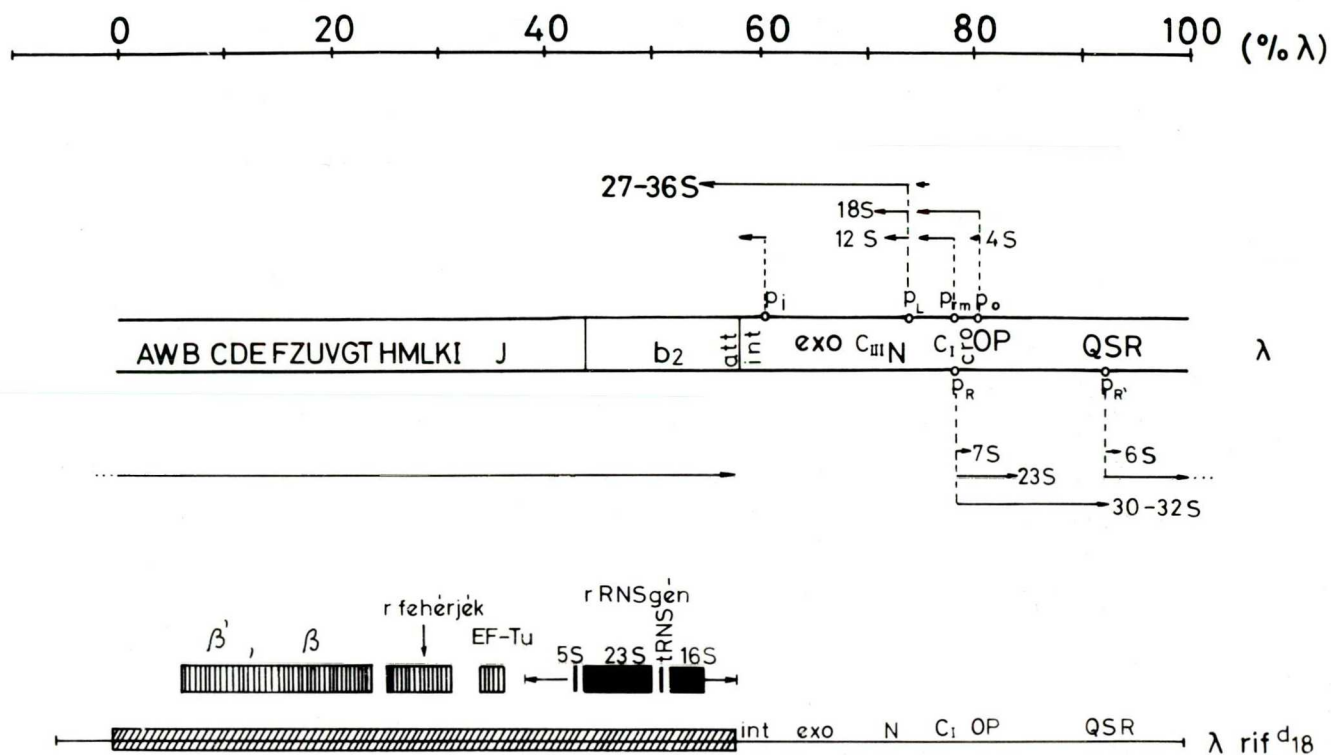
1. ábra

Az rRNS gének elhelyezkedése *E. coli* DNS-en.

Az ábra az *E. coli* géneket a Taylor-Trotter nevezéktan alapján tünteti fel /85/. A függőleges nyilak a Jarry és Rosset által térképezett /50-51/ 5 S rRNS gének /cqsA, B, C és D/ ill. az rDNS-t transzdukáló fágok génsorrendjének meghatározásával térképezett rRNS transzkripciós egységek /rrnA, B, C, D és E/ /58-68/ elhelyezkedését mutatják az *E. coli* géntérképén. A vízszintes nyilak az rRNS gének transzkripciójának irányát tüntetik fel.

Jarry és mtsai által nem térképezett riboszómális RNS gént /rrnB/ hordoz /60/ a Kirschbaum és Konrad által izolált /61/ λ rif^d 18 fág, melyet úgy nyertek, hogy egy hőindukálható és lizis defektív λ fágot integráltattak az *E. coli* kromoszóma bfe lokusza közelébe és domináns rifampicin rezisztenciára /az RNS-polimeráz β alegységének mutációja/ szelektáltak. Az így nyert transzdukáló fág olyan létfontosságú bakteriális géneket hordoz az rrnB-n kívül, mint az RNS-polimeráz β, β' alegységének /62/, riboszómális fehérjéknek /60/ és a fehérjeszintézisben szerepet játszó elongációs faktornak /EF-Tu/ a génje /63/. Nomura és mtsai rDNS-t transzdukáló fágok felhasználásával kimutatták, hogy az rRNS transzkripciós egység 16 S és 23 S rRNS gének közötti spacer régiója tRNS gént tartalmaz /64/. A λ rif^d 18 fág géntérképe a 2. ábrán látható.

A λ rif^d 18 fággal pontosan megegyező bakteriális géneket transzdukál a Φ 80rif^F fág /65/, melyet az előzőtől függetlenül izoláltak: Φ 80 fágot integráltattak az *E. coli* kromoszóma metB régiójában és metB-re valamint glyT-re szelektáltak. Az a tény, hogy a két függetlenül izolált transzdukáló fág által hordozott bakteriális gének sorrendje megegyezik, azt bizonyítja, hogy ez a génsorrend megfelel az *E. coli* kromoszóma megfelelő régiója sorrendjének. /A két említett fág által transzdukált bakteriális DNS csupán az rRNS gén spacer régiójában lévő tRNS génben különbözik egymástól /64/, ami valószínűleg a transzdukáló fág keletkezésekor más rRNS génekkel történő rekombináció eredménye./



2. ábra

A λ és a λ rif^{d18} fág géntérképének összehasonlítása

Az ábra Szybalski nyomán /83/ a λ gének mellett feltünteti a P_L, P_R, P_{R'}, P_o, P_m és P_i λ promoterekről kezdődő RNS szintézist /vizzintes nyilak/. Az in vitro transzkripció során képződött λ mRNS-ek /78/ szedimentációs állandói is leolvashatók.

A λ rif^{d18} fág géntérképén /64/ a besatírozott rész a transzdukált E. coli gének elhelyezkedését jelzi.

Izoláltak továbbá egy λ dilv5 fágot, valamint plazmidokat /66/, melyek az *E. coli* kromoszóma ilv régiójának környékén elhelyezkedő rRNS transzkripció egységet/rrnC/ hordozzák, ami valószínűleg megfelel cqsB-nek. A λ daroE fág /67/ pedig egy további rRNS gént /rrnD/ transzdukál trkA-aroE-rrnD génsorrenddel, mely valószínűleg cqsD-nek felel meg.

Végezetül rdNS-t transzdukáló fágokat izoláltak az *E. coli* kromoszóma purD-meta régiójából, melyet rrnE-nek neveztek el /68/.

5. Célkitűzés

Mint az a rövid irodalmi összefoglalóból látható, a prokaryota riboszómális RNS gének regulációja lényegesen különbözik a mRNS-ek szintézisének szabályozásától. A különbség abban áll, hogy az rdNS-en nagyságrendekkel intenzivebb transzkripció történhet, mint akár egy derepresszált struktur génen.

E. coli DNS-en végzett kísérletek alapján úgy tűnik, hogy e rendkívül intenzív transzkripció az rdNS többszörös promoterének köszönhető, mely lényegesen nagyobb frekvenciájú RNS-lánciniciációt tesz lehetővé, mint a többi génen.

Az rdNS-t transzdukáló fágok izolálása további távlatot nyitott az rRNS gének in vitro transzkripciójának vizsgálatában. Ezzel ugyanis lehetővé vált, hogy valamely rRNS gén mű-

kódását a többi rRNS géntől elkülönítve tanulmányozzuk, ami *E. coli* DNS-en nem valósítható meg. Másrészt a fág DNS-en sokkal kevesebb a gének száma és azok *in vivo* és *in vitro* transzkripciója is jól ismert, ami pontosabbá és megbízhatóbbá teszi a kísérleti eredményeket, ugyanakkor a fág DNS ép állapotban történő izolálása is sokkal könnyebben megvalósítható, mint egy bakteriális DNS-é.

In vitro transzkripciók kísérleteink elvégzéséhez a λ rif^d18 transzdukáló fág DNS-ét választottuk templátnak, mely a riboszómális RNS transzkripciók egységein kívül más létfontosságú bakteriális géneket is kódol. A következő kérdésekre kerestünk választ:

1. Átiródik-e az rDNS a fágon *in vitro*?
2. Kimutatható-e preferenciális rRNS szintézis a fág DNS-en is?
3. Reiniciációt gátló körülmények között /heparin jelenlétében/ kimutatható-e a gén többszörös átírása, azaz rendelkezik-e többszörös heparin rezisztens promoterral?

II. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vegyszerek:

Kísérleteinkben Amersham gyártmányu ^3H UTP-t, Sigma gyártmányu jelöletlen nukleozid-trifoszfátokat, Merck CsCl-ot és proteinéz K-t, valamint Worthington gyártmányu RN-áz mentes DN-áz I-et használtunk. A heparin és a rifampicin Schwarz-Mann, az agaróz Calbiochem termék volt. RN-áz A-t a Reanal-tól, ^{32}P ortofoszfátot az Izotóp Intézettől /Budapest/, továbbá nitro-cellulóz filtereket a Sartorius és üvegfiltereket a Whatman cégtől vásároltunk. Az összes többi vegyszer Reanal vagy BDH gyártmányu analitikai tisztaságu reagens volt.

Baktérium és fág törzsek:

A kísérletekben felhasznált törzseket és felhasználási területüket az I. táblázat tünteti fel.

Tápoldatok:

LB: 10 g Bacto triptont, 5 g Bacto élesztő kivonatot és 10 g NaCl-ot tartalmaz literenként / $\text{pH} = 7.2$ /.

YTB: 5 g NaCl-ot, 10 g Bacto triptont és 1 g élesztő kivonatot tartalmaz literenként.

C: 0,12 M tris-HCl /p_H= 7,4/

0,08 M NaCl

0,02 M KCl

0,02 M /NH₄/₂SO₄

1 mM MgSO₄

Tartalmaz továbbá 3 g/l tripton és 1 ml/1 nyomelem oldatot.

VB: 14 g K₂HPO₄·x3H₂O

2 g citromsav

0,2 g MgSO₄·x7H₂O

0,9 g NH₄Cl

0,9 g NaH₂PO₄·xH₂O

2 g Na₂HPO₄·x12H₂O literenként.

TB: 1 % Bacto tripton

0,5 % NaCl

Fág DNS preparálás:

A fág izolálást és tisztítást Miller módszerével /69/ végeztük.

A kettős lizogén H 105/ λcI857 S7, λrif^d18/ baktérium törzset 7 l LB tápoldatban növesztettük 30-32 C°-on Microferm fermentorban, majd E_{550nm} = 0,7 értéknél 20 percig indukáltuk 42 C°-on. A hőindukciót követő 3 órás 37 C°-os tenyésztés után a sejteket lecentrifugáltuk és 40-50 ml 0,1 M NaCl, 1 mM MgSO₄, 20 mM tris-HCl és 0,01 % gelatin tartalmu pufferben /p_H= 7,5/ felszuszpendáltuk.

I. táblázat

A felhasznált E. coli törzsek és alkalmazásuk

A t ö r z s			
neve	jellemzője	alkalmazása	eredete
MRE 600	RN-áz I ⁻	rRNS preparálás polimeráz "	P.H. Hofschneider
HB 1100	DN-áz I ⁻	DNS preparálás /bakteriális templát/	Fodor I.
B	vad	DNS preparálás hibri- dizációhoz	F.W. Studier
AB 301/105 /54/	RN-áz III ⁻	30 S rRNS preparálás	J.A. Steitz
K12/ λ cI857 S7/	hőindukálható és lizis defek- tiv λ törzsre lizogén	λ cI857 S7 DNS prep.	N.I. Matvienko
H 105/ λ cI857 S7, λ cI857 S7 drif ^d 18/	λ rif ^d 18 /transzdukáló/ és λ cI 857 S7 /helper/ fágokat tar- talmazó kettős lizogén	λ rif ^d 18 DNS prep.	J.B. Kirschbaum

λ rif^d18: λ cI857 S7 drif^d18 rövidített elnevezése

A sejteket $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lefagyasztva, majd felmelegítve tártuk fel, s ezt követően egy éjszakán át $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ DN-ázzal kezeltük $0-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, hogy a bakteriális DNS-t eltávolítsuk. A sejtfalmaradványokat két egymást követő centrifugálással ülepitettük ki /20 perc, 10.000 rpm , $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ / Janetzki K24 centrifugán. A fágokat $1,3-1,5-1,7\text{ g/cm}^3$ lépcsős CsCl gradienszen tisztítottuk /SW 25 rotor, 24.000 rpm , 2 óra, $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ /. Az $1,5\text{ g/cm}^3$ sűrűségű rétegben megjelenő fágcsíkot fecskendővel leszívtuk és egyensúlyi CsCl gradienszen választottuk szét a transzdukáló fágot a helpertől. /A helper fág DNS-ének molssulya $30,8 \times 10^6$ dalton, míg a transzdukáló fágé $32,6 \times 10^6$ dalton/.

Az ily módon tisztított transzdukáló fágot Chambon A pufferral / $0,01\text{ M tris-HCl}$, $0,01\text{ M NaCl}$, $0,01\text{ M EDTA}$, $0,5\%$ SDS/ / $p_{\text{H}}=8$ / szemben dializáltuk egy éjszakán át szobahőmérsékleten, majd 2 óra hosszat $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ proteináz K-val emésztettük $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A proteináz K-t Chambon B pufferral / $0,5\text{ M tris-HCl}$, $0,01\text{ M EDTA}$, $0,01\text{ M NaCl}$, $0,5\%$ SDS; $p_{\text{H}}=8$ / telített fenollal távolítottuk el. A DNS-t $0,01\text{ M tris-HCl}$, $0,01\text{ M NaCl}$, $0,001\text{ M EDTA}$ pufferral / $p_{\text{H}}=7,5$ / szemben dializáltuk. Az így preparált DNS $\frac{260\text{ nm}}{280\text{ nm}}$ ill. $\frac{260\text{ nm}}{230\text{ nm}}$ extinkció aránya 2 körüli érték volt.

Bakteriális DNS preparálás:

A nukleoid testeket Pettijohn és mtsai módszerével /70/ preparáltuk, majd Gross-Bellard és mtsai eljárásával /71/ izoláltuk a DNS-t.

E. coli HB 1100 törzset 1 liter YTB tápoldatban késői logaritmusos fázisig növesztettünk, gyorsan lehűtöttük és lecentrifugáltuk. A sejteket 4 ml 0,01 M NaN_3 , 20 % szacharóz és 0,1 M NaCl tartalmu 0,01 M tris-HCl pufferban $p_H = 8,1$ szuszpendáltuk és $1/4$ térfogat 4 mg/ml lizozimet tartalmazó 0,05 M EDTA, 0,12 M tris-HCl puffert $p_H = 8,1$ adtunk hozzá. 30 sec-ig 0°C -on hagytuk állni, majd azonos térfogat 1 % Brij-58, 0,4 % dezoxikolát, 2 M NaCl és 0,01 M EDTA vizes oldatával kezeltük 10 percig. A fel nem táródott sejteket alacsony fordulatu centrifugálással távolítottuk el.

A felüluszót Chambon A pufferral szemben dializálva 2 mg/ml proteináz K-val emésztettük 37°C -on 12 órán át. Ezt követően kétszer egymás után azonos térfogat Chambon B pufferral $p_H = 8$ telített fenollal extraháltuk a fehérjéket lassu rollerrel mozgatással, hogy a DNS nyíródását minimálisra csökkentsük. A centrifugálással elkülönített vizes fázist 0,01 M NaCl, 0,01 M EDTA, 0,05 M tris-HCl pufferral $p_H = 8$ szemben dializáltuk. Az RNS szennyeződések eltávolítása végett 50 $\mu\text{g/ml}$ pancreas és 2 $\mu\text{g/ml}$ T1 RN-ázzal kezeltük 37°C -on 4 órán át. Ezután SDS-t adtunk hozzá 0,5 % végkoncentrációban és 50 $\mu\text{g/ml}$ proteináz K-val emésztettük a fentiekhez hasonlóan. A proteináz K-t két egymást követő fenolozással távolítottuk el, majd a DNS oldatot 0,01 M NaCl, 0,0005 M EDTA és 0,01 M tris-HCl pufferral $p_H = 8$ szemben dializáltuk.

RNS-polimeráz preparálás /72/:

Az enzimaktivitást 100 μ l 0,04 M tris-HCl, 0,01 M $MgCl_2$, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ditiotreitól, 0,15 M KCl pufferban / $p_H = 7,9$ / 0,3 mg/ml borjú thymus DNS-en mértük 0,15 mM ATP, GTP, CTP és 0,15 mM ^{14}C UTP /2 mCi/mmol/ koncentrációnál. A mintákat 10 perc szintézis után 37 C° -on jégben lehűtöttük, 3 ml 5 % TCA-val kicsaptuk és Millipore filterre szűrtük.

70 g E. coli MRE 600 sejtet 210 ml 0,05 M tris-HCl, 5 % glicerin, 2 mM EDTA, 0,1 mM ditiotreitól, 1 mM 2-merkaptoetanol, 0,233 M NaCl, 130 μ g/ml lizozim és 23 μ g/ml fenilmétán-szulfonilfluorid jelenlétében késes homogenizátorban 2-3 percig alacsony fordulattal homogenizáltunk. 20 perc állás után 0 C° -on 0,05 % Na-dezoxikolat jelenlétében 30 sec-ig homogenizáltuk alacsony fordulattal, amit 20 perc állás követett 10 C° -on. A DNS-t 30 sec-os magas fordulatu homogenizálással tördeltük szét, melyet 280 ml 0,01 M tris / $p_H = 7,9$ /, 5 % glicerin, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ditiotreitól /un. TGED/ és 0,2 M NaCl hozzáadása után megismételtünk. Centrifugálás után /16 perc, 14.000 rpm, JA 14 rotor/ polymín P oldatot adtunk hozzá 0,35 % végkoncentrációban, majd 5 perc keverés után lecentrifugáltuk. A csapadékot 5 percig homogenizáltuk 0,5 M NaCl-ot tartalmazó TGED pufferban, melyet ismételt centrifugálás követett. A csapadék homogenizálását végül 1 M NaCl tartalmu TGED pufferban ismételtük meg, melyet 30 perc centrifugálás követett 6.000 rpm-en. A felüluszóhoz 100 ml-enként 35 g szilárd

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot adtunk és 20 perc keverés után lecentrifugáltuk /15 perc, 14.000 rpm, JA 14 rotor/. A csapadékot TGED-vel 0,15 M NaCl koncentrációra higitottuk.

DNS-cellulóz kromatográfia:

160 g Whatman CF-11 cellulózt összekevertünk 500 ml 2 mg/ml borju thymus DNS 0,01 M tris-HCl / $p_H = 7,9$ /, 0,001 M EDTA oldatával. 50 C°-on 3 napig szárítottuk, majd éjszakán át liofilizáltuk.

A DNS-cellulóz oszlopot 1 liter 0,15 M NaCl tartalmu TGED pufferral ekvilibráltuk, a higitott $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ csapadék felvitele után 500 ml ekvilibráló pufferral mostuk, és az enzimet 1 liter 0,15-1,0 M NaCl lineáris grádienssel eluáltuk. A polimeráz tartalmu frakciókat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -os precipitációval töményítettük be.

Bio-Gel A 5m kromatográfia:

Az enzimet 0,5 M NaCl tartalmu TGED-vel ekvilibrált Bio-Gel A 5m oszlopon tisztítottuk tovább. Az oszlopot 25 ml/óra sebességgel eluáltuk. A polimerázt tartalmazó frakciókat 1 liter 0,01 M tris-HCl, 0,1 M NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM ditiotreitól, 50 % glicerin pufferral / $p_H = 7,9$ / szemben dializáltuk 1 napon át. Az enzimet a fenti pufferban tároltuk -20 C°-on. Az így nyert polimeráz preparátum SDS-poliakrilamid gélen elemezve 100 % tisztasága volt.

rRNS preparálás:

A hideg rRNS-t VB tápoldatban növesztett MRE 600 sejtekből izoláltuk.

A ^{32}P -jelzett rRNS preparálásakor a baktérium kulturát C tápfolyadékban $0,2 \text{ mCi/ml } ^{32}\text{P}$ ortofoszfát jelenlétében $E_{550\text{nm}} = 0,6$ értékig növesztettük $37 \text{ }^\circ\text{C}$ -on, majd további fél órán át rázattuk $0,05 \text{ M } \text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4 / \text{p}_\text{H} = 6,8/$ jelenlétében, hogy a mRNS-ekből a radioaktivitás kihiguljon.

Gyors hűtés után a sejteket lecentrifugáltuk, $0,01 \text{ M } \text{MgCl}_2$, $0,01 \text{ M tris-HCl}$ pufferral $/\text{p}_\text{H} = 7,5/$ mostuk, majd az ismételt centrifugálást követően $0,01 \text{ M } \text{MgCl}_2$, $0,05 \text{ M tris-HCl}$ pufferban $/\text{p}_\text{H} = 7,5/$ szuszpendáltuk. A sejtek feltárását French press-szel végeztük $0,3 \%$ DEP jelenlétében.

A riboszómákat differenciál centrifugálással tisztítottuk: a sejtörmeléket Janetzki K24 centrifugálással távolítottuk el $/20 \text{ perc, } 10.000 \text{ rpm/}$, majd a felüluszból ultracentrifugán ülepitettük ki a riboszómákat $/65 \text{ rotor, } 60 \text{ perc, } 50.000 \text{ rpm, } 2 \text{ }^\circ\text{C/}$. A riboszómák felszínéről a mRNS-t $0,5 \text{ M } \text{NH}_4\text{Cl}$, $0,01 \text{ M } \text{MgCl}_2$, $0,01 \text{ M tris-HCl } / \text{p}_\text{H} = 7,5/$ pufferral mostuk le, amit ismételt differenciál centrifugálás követett.

$0,01 \text{ M tris-HCl } / \text{p}_\text{H} = 7,5/$, $0,01 \text{ M } \text{MgCl}_2$ -ban történő szuszpendálás után a riboszóma fehérjét háromszor vízzel telített fenollal extraháltuk, majd a fenolt éteres kirázással távolítottuk el a vizes fázisból. Az RNS-t $2,5$ térfogat alkohollal csaptuk ki $0,11$ térfogat 20% CH_3COOK jelenlétében és éjszakán át

-20 C°-on hagytuk állni.

Az 5 S, 16 S és 23 S rRNS-t Kruh leírása szerint /73/ 0,01 M CH₃COONa, 0,1 M NaCl pufferban /p_H= 5,0/ oldott 5-20 % szacharóz gradiensen történő centrifugálással /SW 25 rotor, 18 óra, 25.000 rpm, 4 C°/ választottuk szét. Az összegyűjtött és 2,5 térfogat alkohollal kicsapott frakciókat centrifugálás után 0,01 M tris-HCl, 0,001 M MgCl₂-ban /p_H= 7,5/ oldottuk.

A ³²P-jelzett rRNS specifikus aktivitása 1-2x10⁶ cpm/μg volt. Az egyes rRNS preparátumok tisztaságát 2,4 % akrilamid-0,5 % agaróz gélen ellenőriztük.

³²P-jelzett 30 S rRNS preparálás /57/:

E. coli AB 301/105 sejteket növesztettünk 30 C°-on 50 ml TB tápoldatban E_{550 nm} = 0,3 értékig, lecentrifugáltuk, majd 0,12 M tris-HCl, 1 % glükóz, 0,08 M NaCl, 0,02 M KCl, 0,02 M NH₄Cl, 3 mM Na₂SO₄, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM CaCl₂ és 2 μM FeCl₃ pufferban /p_H= 7,5/ szuszpendáltuk. 100 μCi/ml ³²P ortofoszfátot és 0,4 mg/ml kloramfenikolt adtunk hozzá és 1-2 órán át levegőztettük 30 C°-on. A növekedést 0,5 térfogat 0 C° hőmérsékletű 0,05 M NaCN, 0,075 M KH₂PO₄ /p_H= 7/ hozzáadásával állítottuk le, majd a lecentrifugált sejteket 2-3 ml 1 % SDS, 0,01 M tris-HCl, 1 mM EDTA /p_H= 7,5/ vizes oldatával szuszpendáltuk és 3 percig forró vízfürdőben inkubáltuk. Az így feltárt sejteket háromszor fenollal extraháltuk és az RNS-t alkohollal kicsaptuk.

A lecentrifugált alkoholos csapadékot 10 % glicerin és

0,2 % SDS tartalmu elektroforézis pufferban oldva 1,9 % akrilamid-0,5 % agaróz géltre vittük.

In vitro transzkripció:

Az in vitro rRNS szintézist 2-5 μg $\lambda\text{rif}^{\text{d}}$ 18, ill. 5-10 μg E. coli HB 1100 DNS-en 0,04 M tris-HCl, 0,02 M MgCl_2 , 0,1 mM ditiotreitól, 0,05 M KCl és 10 % glicerin tartalmu pufferban p_H = 7,9/ végeztük 37 $^\circ\text{C}$ -on 15-25 percig 400 μM ATP, GTP, CTP és 50 μM ^3H UTP /1-2 mCi/ μmol / koncentrációnál 0,2-15 közötti polimeráz/DNS sulyarányánál. A reakcióelegy végtérfogata 250 μl volt.

A DNS-t megfelelő ionerősségnél 37 $^\circ\text{C}$ -on 10 percig előinkubáltuk, majd további 10 perces inkubáció következett 37 $^\circ\text{C}$ -on az RNS-polimeráz hozzáadása után. A reakciót a ribonukleozid-trifoszfátok adásával indítottuk, majd 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RN-áz mentes DN-áz kezeléssel /10 perc, 37 $^\circ\text{C}$ / állítottuk le. A fehérjéket fenolozással távolítottuk el. DN-áz kezelés előtt és fenolozás után kétszer 25 μl -es aliquotot 1 ml hideg 10 %-os TCA-val kicsaptunk 200 μg BSA jelenlétében, majd 10 perc állás után 0 $^\circ\text{C}$ -on nitrocellulóz filterre szűrtük, és szárítás után toluolos koktélaban mértük a radioaktivitását az összinkorporáció meghatározása céljából. A fenolos felüluszó egy aliquotját /50-60 μl / kompetitív hibridizációs kísérletben a transzkriptum rRNS tartalmának meghatározására használtuk fel.

A heparin jelenlétében végzett transzkripciók kísérleteknél a polimeráz hozzáadása után 10-20 perces disszociáció követ-

kezett 37 C° -on 1-1,2 mg/ml heparin koncentrációnál, majd a ribonukleozid-trifoszfátokkal indítottuk a reakciót. Azokban a kísérletekben pedig, amikor az azonnali RNS-lán iniciációra képes promoterekről induló RNS szintézist akartuk vizsgálni, a ribonukleozid-trifoszfátokat rifampicinnel /5 $\mu\text{g/ml}$ / együtt adva indítottuk az in vitro transzkripciót.

Az in vitro transzkriptum specifikus aktivitását a ^3H radioaktivitás mérés hatásfokának /20 %/, az rRNS UMP tartalmának /22 %/ és a ^3H UTP specifikus aktivitásának /1-2 mCi/ μmol / ismeretében határoztuk meg.

Hibridizációs kísérletek:

A transzkripció kísérletekben felhasznált $\lambda\text{rif}^d 18$ és E. coli DNS rDNS tartalmát telítési hibridizációval határoztuk meg minden egyes preparátum esetében Gillespie és Spiegelman módszere /74/ szerint.

A DNS-t 0,1 SSC-ben /SSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M Na-citrát, $p_{\text{H}} = 7,0$ / hővel denaturáltuk /8-10 perc, 100 C° /, jégben gyorsan lehűtöttük, majd azonos térfogat 12 SSC-t adtunk hozzá. Ismert mennyiségű DNS-t 6 SSC-ben áztatott nitrocellulóz filterre szűrünk, és a filterek mindkét oldalát 2x15 ml 6 SSC-vel mostuk 30 Hgmm vakuumnál. A filtereket 2 órán át vakuumban szárítottuk szobahőmérsékleten, majd további 2 órán át 80 C° -on.

A hibridizációt 2 SSC-ben végeztük 16-20 órán át 67 C° -on, növekvő mennyiségű ^{32}P -jelzett 1:1:1 moláris arányu 5 S, 16 S

és 23 S rRNS jelenlétében. A hibridizációt követően a filtereket háromszor 10-10 ml 2 SSC-vel mostuk mindkét oldalon, majd 50 µg/ml pancreas RN-ázzal emésztettük szobahőmérsékleten 1 órán át. Ezután ismételten 2 SSC-vel mostuk az előzőhöz hasonlóan, száritottuk és toluolos szcintillációs koktélaban mértük a radioaktivitást.

A transzkriptum rRNS tartalmát kompetíciós hibridizációval határoztuk meg. 3-4 µg λ rif^d18 ill. 25-50 µg E. coli DNS-t szűrtünk denaturálás után nitrocellulóz filterre a fentiek szerint. A hibridizációt 2 SSC-ben végeztük, mely tartalmazta a transzkripciós elegy egy aliquotját, továbbá 5-10 ng ³²P rRNS belső standardot. Egy másik hasonló hibridizációs elegy a fentiek kivül tartalmazott még 10-15 µg kompetitor rRNS-t.

Kísérleteinkben nagyon fontos volt a transzkriptum rRNS tartalmának pontos meghatározása. Az irodalomban számos módszer ismeretes erre a célra, melyek közül Lazzarini és Johnson eljárását /75/ alkalmaztuk. Ennek lényege, hogy kis mennyiségű ³²P-jelzett RNS belső standard segítségével mérjük a hibridizáció efficienciáját minden egyes hibridizációs elegyben, és az így meghatározott hibridizációs efficiencia ismeretében számolják ki a kompetíció mértékéből a kérdéses RNS mennyiségét.

Az in vitro transzkriptum vizsgálata gélen:

10-40 µg λ rif^d18 DNS-en in vitro transzkripciót végeztünk növekvő polimeráz/DNS aránynál 400 µM ATP, GTP, CTP és

50 μM ^3H UTP koncentrációjánál. 10-15 perc szintézis után 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rifampicin adásával akadályoztuk meg az újabb RNS-lánc iniciációt, és 3 mM hideg UTP jelenlétében további 20 percig inkubáltuk a reakcióelegyet 37 $^{\circ}\text{C}$ -on, amit DN-áz kezelés és fenolozás követett. Két 10 μl -es aliquotot 10 %-os TCA-val kicsaptunk az össz inkorporáció meghatározása céljából. A reakcióelegy többi részét 0,11 térfogat 20 %-os K-acetát jelenlétében -20 $^{\circ}\text{C}$ -os alkohollal kicsaptuk, éjszakán át -20 $^{\circ}\text{C}$ -on hagytuk állni, majd centrifugálás után 10 % glicerint és 0,2 % SDS-t tartalmazó elektroforézis pufferban oldottuk.

Az in vitro szintetizált RNS-t ^{32}P -jelzett 16 S, 17,5 S, 23 S, 25 S és 30 S rRNS molsúly standardok jelenlétében 0,5 % agarózt tartalmazó 1,9 % akrilamid-0,1 % NN'-metilén-bisakrilamid gélen futtattuk 0,5x10 cm méretű csövekben /84/. A géleket 1-2 órán át ekvilibráltuk 80 V-on 0,09 M tris-HCl, 0,09 M bórsav, 2 mM EDTA, 0,2 % SDS pufferral / p_H = 8,6/, majd a minta felvitele után 2,5 órán át futtattuk 80 V-on szobahőmérsékleten.

A gélek UV abszorpcióját Gilford 250 regisztráló spektrofotométeren követtük. A géleket szárazjéggel lefagyasztottuk és 1 mm-es szeletekre vágtuk. A ^{32}P -jelzett RNS-t tartalmazó gélseleteket Whatman szűrőpapír korongokra szárítva toluolos szcintillációs keverékben mértük, a ^3H -jelzett in vitro transzkriptumot tartalmazó gélseleteket pedig 10 ml NCS-toluol keverékben /5 g PPO és 40 ml NCS 1 literben/ 16 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd szcintillációs spektrométeren mértük.

Az OD_{260nm} profil ismeretében az egyik in vitro transzkriptumot tartalmazó gélt 4 részre vágtuk, és az RNS-t Rubin leírása /76/ szerint izoláltuk a gélből. A géldarabokat 100 µg patkány máj tRNS jelenlétében 1,5 ml 0,5 M NaCl, 0,1 M tris-HCl, 0,01 M EDTA pufferral /p_H= 9,1/, valamint 1 ml 0,01 M tris-HCl-val /p_H= 7,6/ telített fenollal homogenizáltuk Potter-Elvehjem homogenizátorral. 30 perc állás után 0 C^o-on lecentrifugáltuk, a vizes fázist leszivtuk és a fenolos fázist 1 ml fenti pufferral reextraháltuk. Az egyesített vizes fázisokból a gélmарadványokat kiülepitettük /JA 20 rotor, 20 perc, 16.000 rpm/. A felüluszót a már ismertetett módon alkohollal kicsaptuk. A gélből visszanyert RNS mennyiségét egy aliquotjának TCA-s kicsapásával határoztuk meg, egy további részletével pedig kompetíciós hibridizációt végeztünk az rRNS tartalom megállapítása végett.

Radioaktivitás mérés:

A ³H-jelzett, valamint a ³H-³²P kettős jelölésű mintákat toluolos koktélaban /4 g PPO, 0,05 g POPOP 1 liter toluolban/ mértük Beckman LS 200 liquid szcintillációs spektrofotoméberen, az utóbbi esetben figyelembe véve az alkalmazott ³²P csatorna átfedését a ³H csatornába.

A ³²P-jelzett vizes minták radioaktivitását Cserenkov sugárzás alapján mértük. A gélseletek radioaktivitását a már említett módon határoztuk meg.

III. A Z E R E D M É N Y E K I S M E R T E T É S E É S M E G V I T A T Á S A

1. In vitro rRNS szintézis λ rif^d18 DNS-en

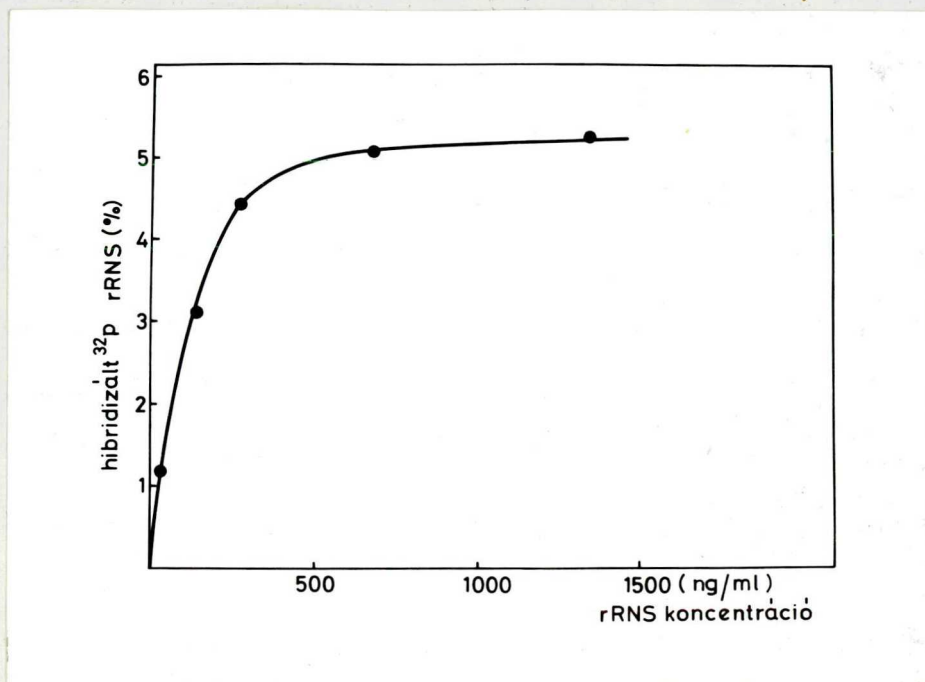
A λ rif^d18 fág DNS-ének kb. 65 %-át foglalják el bakteriális gének, s mivel azok a b_2 régiót és a késői λ géneket helyettesítik, így az in vitro transzkripcióban szerepet játszó korai λ gének e fág DNS-en is megtalálhatók /2. ábra/. Így a λ rif^d18 DNS-en szintetizálódott in vitro transzkriptumnak λ mRNS-eket és bakteriális RNS-eket kell tartalmaznia, amennyiben a transzdukált gének működőképesek. A transzkripció irányának ismeretében megállapíthatjuk, hogy a riboszómális RNS gén promoterének e fág DNS-en a bakteriális gének között szélső térképhezelyzetűnek kell lennie, így megvan a veszélye annak, hogy a rekombináció során az rDNS promotere nem került rá a transzdukáló fagra. Nomura és mtsai kísérletei azt bizonyítják, hogy az rRNS gén in vivo működőképes a fág DNS-en, ugyanis rRNS szintézist tudtak kimutatni UV-besugárzott E. coli sejtek λ rif^d18 fággal történő fertőzésekor /60/.

Kísérleteink során az első feladat az volt, hogy megvizsgáljuk, vajon az rDNS in vitro is átíródik-e a fág DNS-en, azaz ki lehet-e mutatni in vitro rRNS szintézist a fág DNS-en; ha igen, ez milyen mértékű, tekinthető-e preferenciálisnak éppúgy, mint E. coli DNS templáton.

Ehhez mindenekelőtt igen pontosan meg kellett határozni a λ rif^d18 DNS rDNS tartalmát. A 3. ábra a λ rif^d18 DNS telítési hibridizációját mutatja 1:1:1 moláris arányu ³²P-jelzett 5SS, 16 S és 23 S rRNS-sel. A kísérletek során 5-5,24 % rRNS hibridizált λ rif^d18 DNS-hez, ami - figyelembe véve, hogy a spacer régió a 30 S rRNS-nek kb. 20 %-át teszi ki /77/ - jól egyezik mind az elméletileg várható értékkel egyetlen rRNS transzkripciós egység transzdukcióját feltételezve /6,4 %/, mind Nomura és mtsai eredményeivel /60/.

Egyszerű transzkripciós rendszerben végzett kísérleteink szerint az rDNS in vitro is átíródik a fág DNS-en, sőt, mint az a 4. és 5. ábrán látható, még preferenciális rRNS szintézisről is beszélhetünk. 0,3 polimeráz/DNS súlyaránynál ugyanis az össz transzkriptum közel 60 %-a rRNS, ami azt jelenti, hogy ennél az alacsony polimeráz/DNS aránynál a λ rif^d18 fág génjei közül főként a riboszómális RNS génen történik RNS szintézis /4. ábra/. A polimeráz/DNS arány emelésével a szintetizált rRNS mennyisége tovább nő, míg végül telítési értéket ér el, és jöllehet a transzkriptum %-os rRNS tartalma csökken, még magas polimeráz/DNS aránynál is 20 % körül mozog, ami önmagában is preferenciális rRNS szintézisre vall. Az a tény, hogy az in vitro szintetizált RNS %-os rRNS tartalma a polimeráz/DNS arány növelésével csökken, arra utal, hogy magasabb polimeráz/DNS aránynál a λ rif^d18 DNS többi génjén is intenzívebb transzkripció indul meg.

Mindebből arra következtethetünk, hogy az rRNS gén valamilyenféleképpen kitüntetett a többi génhez képest, mivel az rDNS



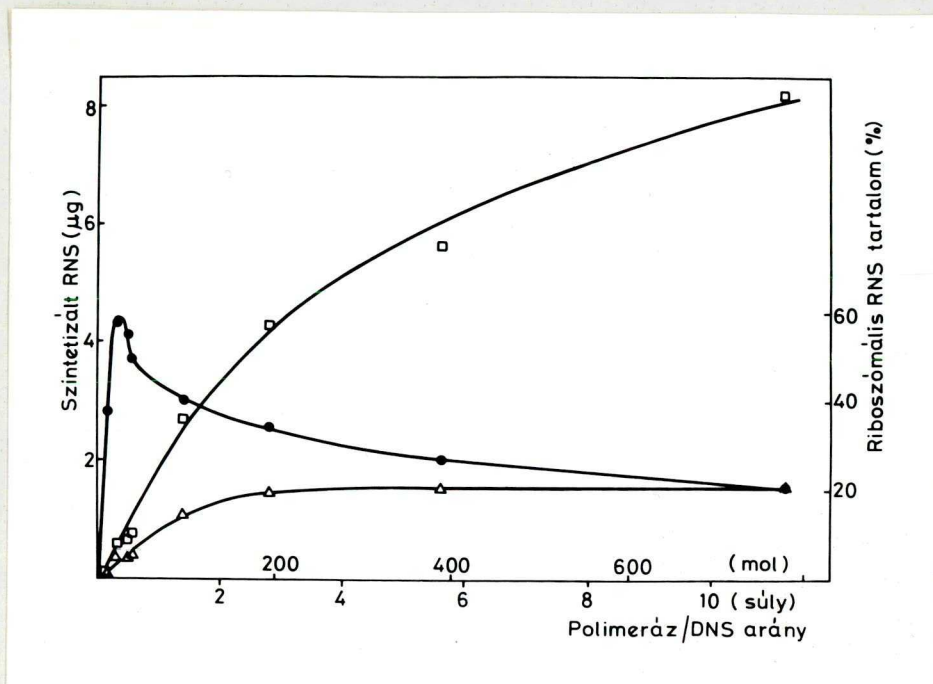
3. ábra

Telítési hibridizáció λ rif^d 18 DNS-en ³²P rRNS-sel

2 μ g denaturált λ rif^d 18 DNS-t hibridizáltunk filteren növekvő mennyiségű 1:1:1 moláris arányú ³²P-jelzett 5 S, 16 S és 23 S rRNS-sel. A hibridizációs elegyek térfogata 1 ml volt. A hibridizált ³²P rRNS mennyiségét a filteren lévő DNS %-ában adtuk meg. A ³²P rRNS specifikus aktivitása 300.000 cpm/ μ g volt.

promotere alacsonyabb polimeráz/DNS aránynál tud polimeráz molekulákkal telítődni, mint a többi gén promotere.

Ha az in vitro szintetizált RNS-t E. coli B DNS-hez hibridizáljuk - feltételezve, hogy az egyes E. coli eredetű fág



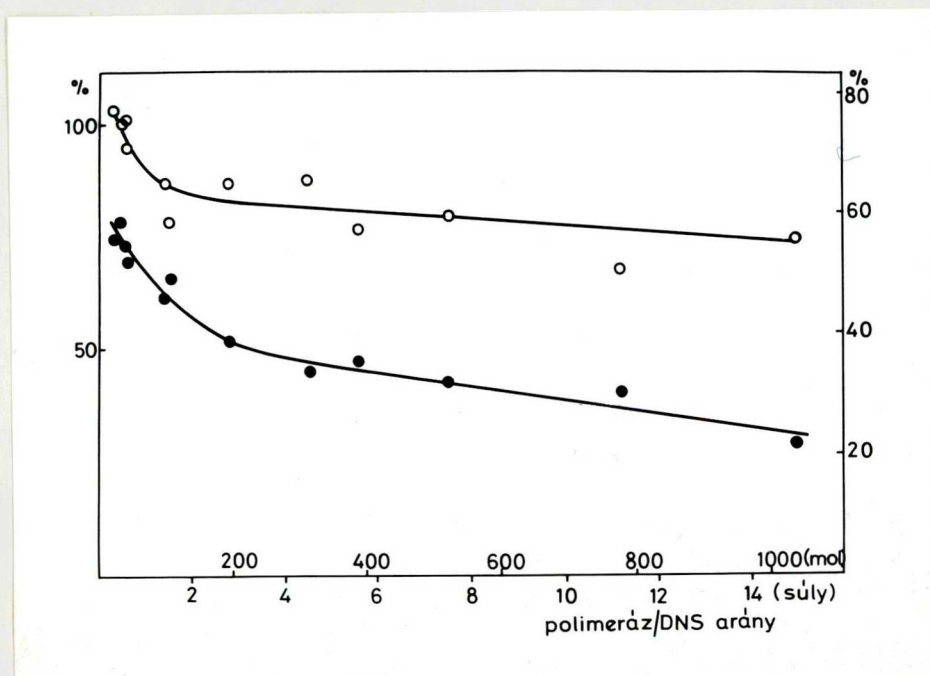
4. ábra

In vitro rRNS szintézis λ rif^d18 DNS-en a polimeráz/DNS arány függvényében /a/

2,5 μg λ rif^d18 DNS-en végeztünk in vitro transzkripciót 37°C -on 15 percig $400 \mu\text{M}$ ATP, GTP, CTP és $50 \mu\text{M}$ ^3H UTP koncentrációnál /2 mCi/ μmol / az ábrán feltüntetett polimeráz/DNS arányoknál. Az in vitro transzkripció körülményei és a transzkriptum rRNS tartalmának meghatározása azonos volt az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírtakkal.

- a szintetizált össz RNS mennyisége μg -ban kifejezve
- △ a szintetizált össz rRNS mennyisége μg -ban kifejezve
- a transzkriptum %-os rRNS tartalma.

génekről szintetizált rRNS-ek hibridizációs efficienciája nem tér el jelentősen egymástól - a kompetíció mértékéből megállapítható, hogy az *E. coli* eredetű transzkriptum hány %-a rRNS egy adott polimeráz/DNS aránynál.



5. ábra

In vitro rRNS szintézis λ rif^d 18 DNS-en a polimeráz/
/DNS arány függvényében /b/

A reakció körülmények és a felhasznált templát mennyisége azonosak a 4. ábránál leírtakkal.

A λ rif^d 18 DNS-en nyert in vitro transzkriptumot *E. coli* B DNS-hez hibridizáltuk, és nagy felesleg hideg rRNS jelenlétében kapott kompetíció mértékéből határoztuk meg a bakteriális eredetű génekről szintetizált in vitro transzkriptum %-os rRNS tartalmát /jobb oldali ordináta/.

A λ rif^d18 fág E. coli eredetű génjeiről szintetizált RNS az össz transzkriptum %-ában /bal oldali ordináta/.

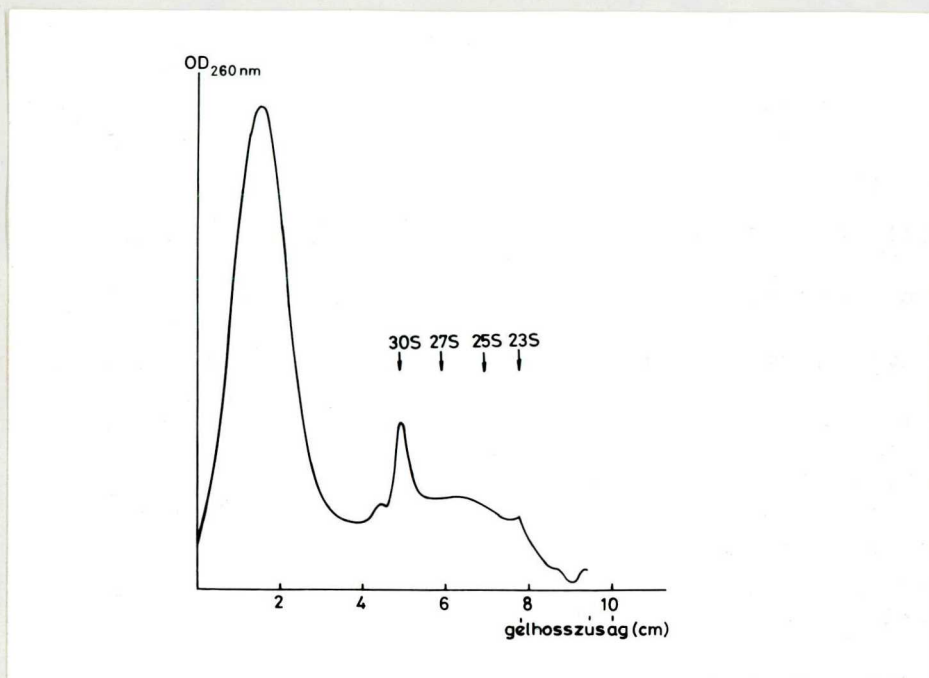
Mint az 5. ábrán látható, a riboszómális RNS gén a bakteriális eredetű gének között is preferenciálisan nyilvánul meg, ugyanis alacsony polimeráz/DNS aránynál túlnyomórészt rRNS szintetizálódik. A %-os rRNS tartalom a polimeráz/DNS arány emelkedésével kissé csökken, annak megfelelően, ahogyan a többi E. coli eredetű gén promotere is telítődik polimeráz molekulákkal.

Az in vitro transzkriptum %-os rRNS tartalmának, valamint az E. coli eredetű génekről szintetizált transzkriptum %-os rRNS tartalmának ismeretében kiszámíthatjuk, hogy az E. coli génekről szintetizált RNS az össz szintetizált RNS hány %-a egy adott polimeráz/DNS aránynál. Az 5. ábra mutatja, hogy alacsony polimeráz/DNS aránynál főként az E. coli eredetű génekről szintetizálódik RNS, melynek %-os aránya csak magas polimeráz/DNS aránynál csökken le, amikor a λ géneken is intenzív transzkripció folyik. Ugy tűnik tehát, hogy az E. coli gének promoterei alacsonyabb polimeráz/DNS aránynál képesek telítődni polimeráz molekulákkal, mint a λ rif^d18 DNS λ eredetű génjei, az rRNS gén azonban még a transzdukált gének között is preferenciálisan nyilvánul meg.

Az rRNS kedvezményezett in vitro szintézise λ rif^d18 DNS-en azt bizonyítja, hogy az rDNS promotere is transzdukáló-

dott, ugyanis egyetlen λ promoterről történő továbbolvasás sem eredményezhet önmagában véve ennyire kedvezményezett rRNS szintézist. A legközelebbi λ promoterről, az int gén promoteréről in vitro nem indul kimutatható mennyiségű RNS szintézis /78/, továbbá a gén in vivo működése is c_{II} és c_{III} terméket igényel /79/, tehát az rDNS p_i promoterről kezdődő továbbolvasása nem lehet számottevő kísérleteinkben. Az egyetlen olyan promoter pedig, melyről számottevő továbbolvasás történhet ezen körülmények között, a p_L promoter, annyira messzire van az rRNS géntől, hogy az arról induló RNS szintézisnek - mégha feltételezzük is, hogy egyetlen λ mRNS lánc terminációja sem történik meg - felül kellene múlania az rRNS szintézis mértékét. Ez azonban, mint láttuk, nem így van, így tehát nem képzelhető el, hogy az in vitro rRNS szintézis a λ rif^d18 DNS-en kizárólag továbbolvasás eredménye legyen, hanem abban az rDNS promoteréből induló transzkripciónak lényeges szerepet kell játszania.

Annak a kérdésnek az eldöntésére, hogy milyen mértékű a λ promoterekről történő továbbolvasás a fág DNS-en, meghatároztuk a szintetizált rRNS molsúlyát. ³H-jelzett transzkriptumot futtattunk 1,9 % akrilamid-0,5 % agaróz gélen az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon ³²P-jelzett 16 S, 17,5 S, 23 S, 25 S és 30 S rRNS molsúly standardok jelenlétében. Egy alacsony polimeráz/DNS aránynál szintetizált transzkriptumot tartalmazó gél OD_{260nm} profilját mutatja a 6. ábra.



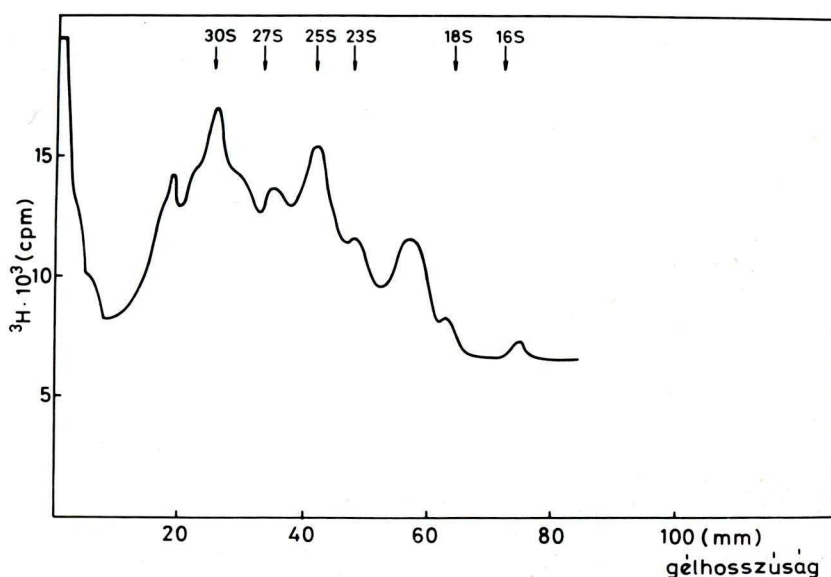
6. ábra

Alacsony polimeráz/DNS arányánál szintetizált λ rif^d 18 transzkriptum UV-abszorpciós profilja

40 μ g λ rif^d 18 DNS-en 0,33 polimeráz/DNS arányánál szintetizált in vitro transzkriptumot 1,9 % akrilamid-0,5 % agaróz gélen futtattunk 16 S - 30 S rRNS molsúly standardok jelenlétében az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon. A gél UV-abszorpcióját Gilford 250 regisztráló spektrofotométeren rögzítettük 260 nm hullámhosszuságon.

Az első nagy OD csucs, mely radioaktivitást nem tartalmaz, valószínűleg a templát DNS DN-áz emésztése után még visszamaradt DNS darabokat tartalmazza. Látható, hogy a transzkriptum

fő OD csucsa, mely a legnagyobb radioaktív csuccsal esik egybe, 30 S körüli értéknek felel meg. Tekintettel arra, hogy a hibridizációs kísérletek alapján 0,31:1 polimeráz/DNS sulyarányánál szintetizált transzkriptum több, mint 50 %-a rRNS, feltételezhetjük, hogy ez az OD csucs felel meg az rDNS-ről szintetizált RNS-nek.



7. ábra

0,31:1 polimeráz/DNS sulyarányánál szintetizált λ rif^d 18 transzkriptum molsúly szerinti eloszlása

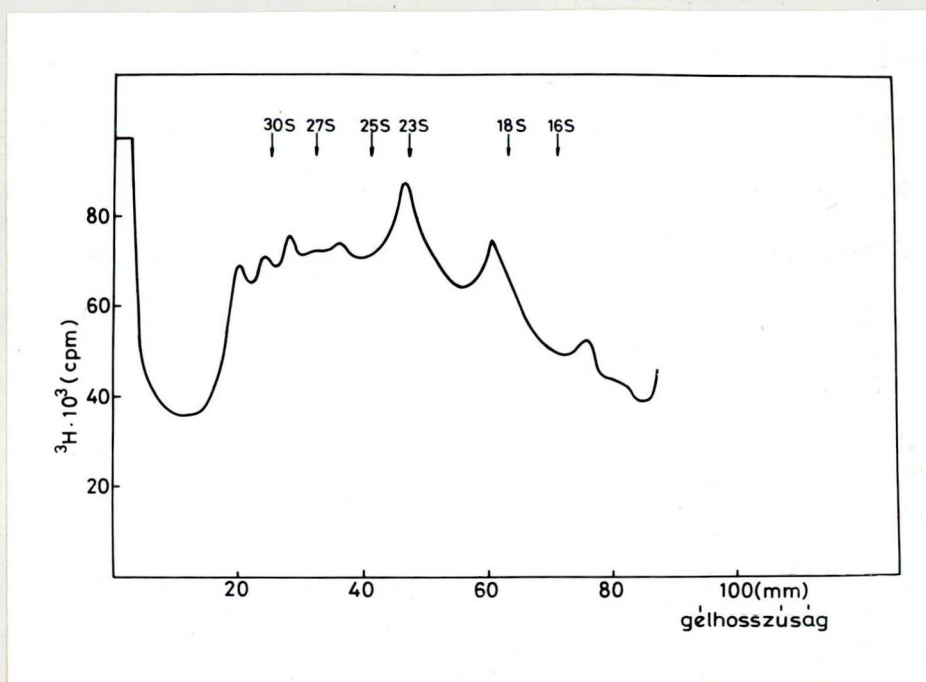
^3H -jelzett λ rif^d 18 in vitro transzkriptumot futtattunk 1,9 % akrilamid-0,5 % agaróz gélen ^{32}P -jelzett rRNS molsúly standardok jelenlétében. 1 mm-es gélseletek radioaktivitását mértük NCS-sel történő szolubilizálás után az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírtak szerint.

A ^{32}P -jelzett molsúly standardok radioaktivitását Whatman szűrőpapír korongokra szárítva toluolos szcintillációs koktélaban mértük.

In vitro transzkriptumot tartalmazó 1 mm-es gélseletek radioaktivitását mutatja a 7. és 8. ábra. 0,31:1 polimeráz/DNS sulyarányánál a transzkriptum fő csucsa 30 S körüli /7. ábra/, tartalmaz továbbá egy 25 S, valamint egy kb. $8,5 \times 10^5$ molsúlyú RNS-t nagyobb mennyiségben, míg az in vitro λ transzkripcióra jellemző 27 S, 23 S és 18 S RNS-ek csak kis mennyiségben vannak jelen. Ugyanakkor magasabb polimeráz/DNS arányánál ez utóbbi komponensek válnak uralkodóvá a transzkriptumon belül /8. ábra/, s az alacsony polimeráz/DNS arányra jellemző, s valószínűleg a bakteriális RNS-eknek megfelelő csucskok háttérbe szorulnak. Mindez összhangban van a hibridizációs eredményekkel, nevezetesen, hogy a polimeráz/DNS arány növekedésével csökken a bakteriális, és nő a λ RNS-ek relatív mennyisége a transzkriptumon belül.

Néhány 0,31:1 polimeráz/DNS sulyarányánál szintetizált in vitro transzkriptumot tartalmazó gélét az UV-abszorpciós profil ismeretében sávokra daraboltunk, majd az RNS-t izoláltuk az egyes gél szeletekből. A visszanyerés 42 %-os volt. Kompetitív hibridizációval meghatároztuk az egyes gélterületek rRNS tartalmát. A hibridizáció eredményét a II. táblázat mutatja. Látható, hogy bár minden molsúly tartományban található rRNS, azonban az rRNS túlnyomó többsége 30 S vagy ennél kisebb ülepedési állandóju. Ebből arra következtethetünk, hogy a p_L λ promoterről történő továbbolvasás nem jelentős, hiszen 30 S-nél nagyobb tartományba az össz RNS-nek csak 14,6 %-a esik, s ennek csak egy részét teszi ki a λ promoterről induló továbbolvasás révén keletkezett rRNS, másik részét pedig az

rDNS promoteréről kezdődő és a bakteriális gének irányában továbbolvasódó transzkripciónak kell adnia, mely szintén 30 S-nél nagyobb szedimentációs állandóju RNS-t eredményez.



8. ábra

3,12:1 polimeráz/DNS sulyarányánál szintetizált λ rif^d18 transzkriptum molsúly szerinti eloszlása

A polimeráz/DNS arány kivételével a reakció-körülmények, valamint az in vitro transzkriptum molsúlyeloszlásának vizsgálata azonos volt a 7. ábránál leírtakkal.

A hibridizációs kísérletek azt is bizonyítják, hogy a 30 S körüli OD_{260nm}-es és radioaktív csucs valóban az in vitro szintetizált rRNS-nek felel meg, hiszen az ebből a géltartományból izolált RNS 74 %-a rRNS. A 19-29 S régióban ugyan

mennyiségre nézve több rRNS található, de az négy csucs között oszlik meg, és az innen izolált RNS-nek kisebb hányada rRNS. Ugy tűnik, hogy a 30 S rRNS csucsa hosszan elnyúlik az alacsonyabb molsúly tartományokba és erre tevődnek rá az egyéb RNS fajták csucsei. A 30 S-nél kisebb rRNS *in vitro* transzkriptum valószínűleg korai termináció következménye, melyet az egyes fág DNS molekulák sérült volta vagy más ok idézhet elő.

II. táblázat

Alacsony polimeráz/DNS aránynál szintetizált rRNS molsúly szerinti eloszlása

molsúly tartomány	gél- /mm/	rRNS tartalom		rRNS tartalom az össz rRNS %-ában
		%	ng	
> 30 S	0-21,6	34,78	223,3	14,6
30 S körüli OD _{260nm} csúcs	21,6-32,8	73,68	469,7	30,6
19-29 S	32,8-58,0	51,23	558,4	36,4
< 19 S	58,0-85,0	78,65	281,5	18,4

0,31:1 polimeráz/DNS aránynál az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon szintetizált ³H-jelzett *in vitro* transzkriptumot elektroforetizáltunk 1,9 % akrilamid-0,5 % agaróz gélen ³²P-jelzett rRNS molsúly standardok jelenlétében. A gélek UV abszorpcióját Gilford 250 spektrofotométeren regisztr-

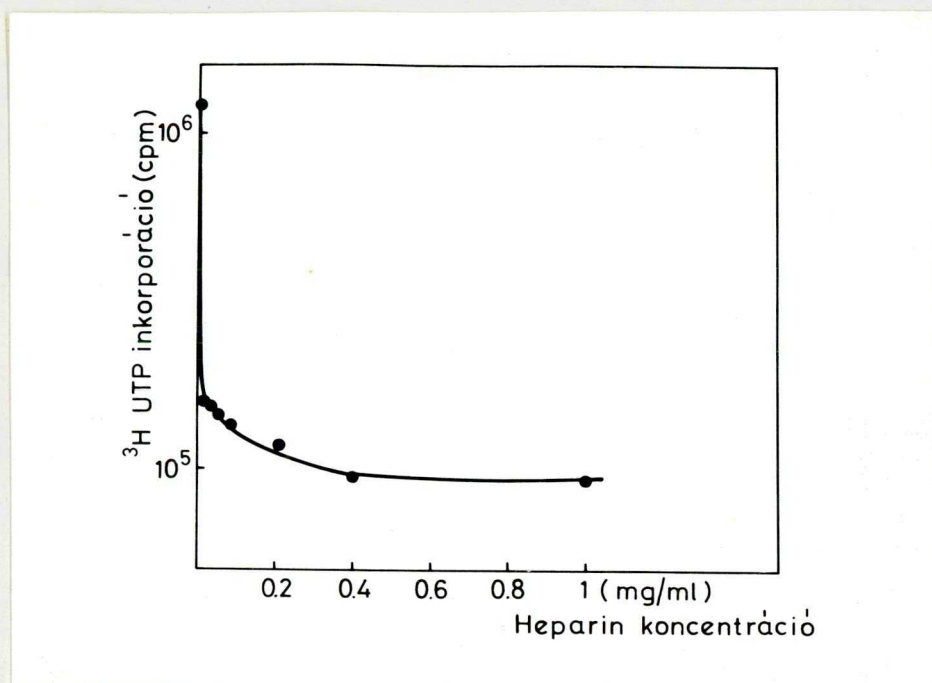
ráltuk, majd a transzkriptumot tartalmazó gélt 4 sávra daraboltuk. Az rNS-t Rubin módszerével /76/ izoláltuk az egyes gél darabokból, és ^{32}P -jelzett rRNS belső standard jelenlétében végzett kompetíciós hibridizációval meghatároztuk az egyes gélcsávok rRNS tartalmát.

Az egyszerű transzkripció rendszerben végzett kísérletekből tehát megállapíthatjuk, hogy az rDNS in vitro is képes átíródni a λ rif^d18 DNS-en, és az erről szintetizálódott rRNS fő komponensének molsulya megfelel az in vivo képződött primer transzkriptum molsulyának /56, 57/, továbbá az rDNS a transzdukáló fág DNS-en is preferenciálisan nyilvánul meg. A λ rif^d18 fág DNS tehát alkalmasnak látszik arra, hogy az rDNS kedvezményezett in vitro átírásának okát kutassuk a segítségével.

2. rRNS szintézis λ rif^d18 DNS-en heparin jelenlétében

A következő feladat az volt, hogy megvizsgáljuk, van-e preferenciális rDNS átírás a transzdukáló fág DNS-en olyan körülmények között is, amikor megakadályozzuk a polimeráz molekulák reiniciációba lépését azzal, hogy a transzkripciót heparin jelenlétében végezzük.

Ehhez mindenekelőtt a heparinos disszociáció optimális körülményeit kellett megkeresni a λ rif^d18 DNS-en.

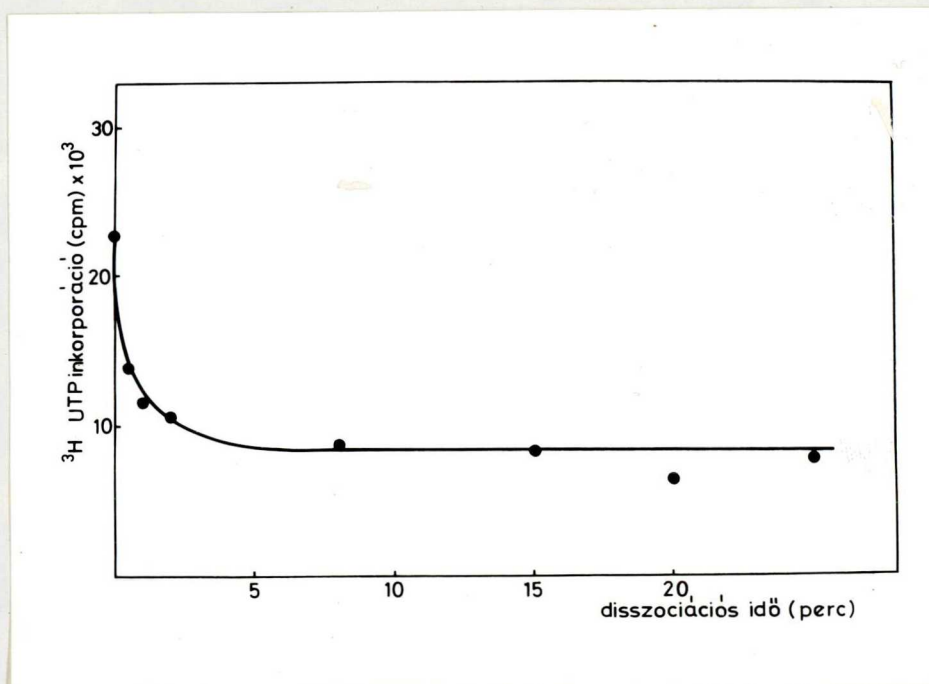


9. ábra

In vitro RNS szintézis λ rif^d18 DNS-en a heparin koncentráció függvényében

2,45 μ g λ rif^d18 DNS-t 9,45 μ g RNS-polimerázzal 37 °C-on 10 percig előinkubáltunk, melyet 10 perces disszociáció követett heparin jelenlétében az ábrán feltüntetett koncentrációknál. A reakcióelegy végtérfogata 100 μ l volt. Az in vitro RNS szintézist 1 mM ATP, CTP, GTP és 50 μ M ³H UTP koncentrációnál végeztük, a ribonukleozid-trifoszfátok hozzáadásával indítva a reakciót. 15 perc szintézis után 37 °C-on a reakcióelegyet 1 ml 10 %-os TCA-val kicsaptuk 150 μ g BSA jelenlétében, az össz RNS szintézis meghatározása céljából. A filterre szűrt TCA-s csapadék radioaktivitását teluolos szcintillációs keverékben mértük.

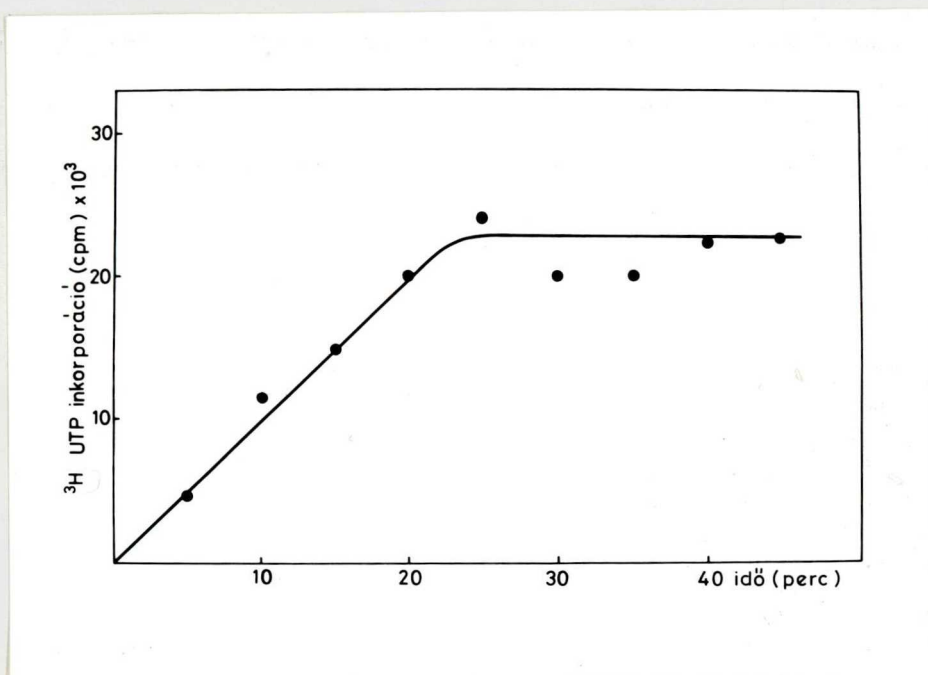
A 9. ábra az össz RNS szintézis változását tünteti fel, ^3H UTP inkorporációban kifejezve, a heparin koncentráció függvényében. Látható, hogy 0,5-1 mg/ml heparin koncentráció szükséges 10 perc disszociációs idő esetén a heparin érzékeny kötött polimeráz molekulák tökéletes inaktiválásához. 1 mg/ml vagy ennél magasabb heparin koncentrációnál a heparin érzékeny DNS-polimeráz komplexek disszociációja 5-8 perc alatt lejátszódik /10. ábra/. Ilyen körülmények között végzett transzkripció esetén a λ rif^d 18 DNS-en kb. 25 percig lineáris a ^3H UTP beépülés, majd telítési értéket ér el /11. ábra/, ami arra utal, hogy csak a heparin rezisztens komplexek által indított RNS-láncok elongációja fejeződik be, új RNS láncok szintézise nem történik.



10. ábra

RNS szintézis λ rif^d 18 DNS-en a heparinos disszociáció időtartamának függvényében

3,75 μg λ rif^d18 DNS-en 2,8:1 polimeráz/DNS sulyarányánál, 1 mg/ml heparin koncentrációjánál végeztünk in vitro transzkripciót 100 μl végtérfogatban. A heparin hozzáadása után az ábrán feltüntetett időpontokban /0-25 perc/ indítottuk az RNS szintézist /1 mM ATP, GTP, CTP, 50 μM ³H UTP/, majd 20 perc múlva 10 %-os TCA-val kicsaptuk a reakcióelegyet az össz inkorporáció meghatározása céljából.



11. ábra

Heparin rezisztens RNS szintézis λ rif^d18 DNS-en az idő függvényében

8,5 μg λ rif^d18 DNS-en végeztünk in vitro transzkripciót 5,5:1 polimeráz/DNS sulyarányánál 1 mg/ml heparin koncentrációjánál. A reakcióelegy végtérfogata 300 μl , a heparinos disszociáció időtartama 10 perc volt. A ribonukleozid-trifoszfátok /1 mM



ATP, GTP, CTP és $50 \mu\text{M}$ ^3H UTP/ hozzáadása után $25 \mu\text{l}$ -es aliquotokat az ábrán feltüntetett időpontokban TCA-val kicsaptunk az össz inkorporáció meghatározása végett.

A III. táblázat tanúsága szerint a λ rif^d18 DNS-en gyakorlatilag nincs heparin rezisztens rRNS szintézis még polimeráz telítésnél sem, a kapott minimális érték valószínűleg továbbolvasás vagy a DNS sérülési helyeiről történő hibás iniciáció következménye. Heparin rezisztensen a templátnak csak kb. 10 %-a íródik át, ami valószínűleg megfelel a p_L és p_R λ promoterekről induló RNS szintézisnek, amiről ismeretes, hogy heparin rezisztens /80/.

Tehát annak ellenére, hogy a λ rif^d18 fág által transzdukált rDNS saját promoteréről indul az rRNS szintézis, sőt, egyszerű transzkripció rendszerben az E. coli rRNS génekhez hasonlóan preferenciális rRNS szintézisre is képes, a két templát által hordozott rDNS-ek heparin rezisztencia szempontjából teljesen eltérőek. Amíg E. coli templáton génenként átlagosan 4-5 polimeráz molekula írja át heparin rezisztensen az rDNS-eket, s ezáltal lehetővé válik, hogy heparin rezisztens polimeráz tároló helyek létezését feltételezzük, mely a preferenciális rRNS szintézis magyarázatát is megadja, addig a λ rif^d18 fág által transzdukált rRNS génen egyáltalán nem megy végbe heparin rezisztens rRNS szintézis. Ennek az ellentmondásnak a magyarázatát megnehezíti, hogy a heparin hatásmechanizmusát nem ismerjük pontosan.

III. táblázat

Heparin rezisztens RNS szintézis λ rif^d18 DNS-en

polimeráz/DNS /sulyarány/	s z i n t e t i z á l t			$\frac{rRNS}{r^+DNS}$
	össz RNS /ng/	rRNS /ng/	rRNS /%/	
0,41	70,8	12,9	18,22	0,03
0,82	284,3	31,24	10,99	0,06
1,63	513,2	49,45	9,64	0,10
3,3	435,5	43,27	9,93	0,09
4,1	487,1	38,91	7,99	0,08
6,6	433,3	50,98	11,77	0,10

10 μ g λ rif^d18 DNS-en RNS-t szintetizáltunk a jelzett polimeráz/DNS arányoknál 1 mg/ml heparin koncentrációnál az Anyagok és módszerek c. fejezetben leírt módon. 10 perc heparin disszociációs idő után 1 mM ATP, CTP, GTP és 50 μ M ³H UTP /2 mCi/ μ mol/ adásával indítottuk a transzkripciót, majd 20 perc múlva RN-áz mentes DN-áz kezeléssel állítottuk le. A reakcióelegy egy részéből TCA-s kicsapás után meghatároztuk az össz RNS szintézist, másik részével pedig kompetíciós hibridizációt végeztünk az rRNS tartalom megállapítása céljából.

Az egyik lehetséges magyarázat az, hogy a hat E. coli rRNS gén különböző, nem mindegyik rendelkezik heparin rezisztens polimeráz tároló hellyel, s a λ rif^d18 fág által hordozott gén az

utóbbiak közé tartozik.

Egy másik hipotézis, ami elméletileg szintén elképzelhető, az, hogy az *E. coli* rDNS-ek ugyan mind egyformák, következésképpen heparin rezisztensek, de a fágon az eltérő génkörnyezet vagy más ok folytán elvesztik heparin rezisztenciájukat annak ellenére, hogy promoter szerkezetük /pl. többszörös polimeráz tároló hely létezése/ egyébként változatlan.

Egy harmadik elképzelés szerint az rDNS promotere előtt, esetleg attól kissé távolabb, található az *E. coli* DNS-en egy polimeráz tároló hely vagy ún. szuper promoter, ahová az RNS-polimeráz heparin rezisztensen képes kötődni, és innen gördül át az rRNS szintézis start pontjára anélkül, hogy közben heparin rezisztenciáját elvesztené, és átírná a szuper promotert az rRNS szintézis start pontjától elválasztó DNS régiót. Ha a rekombináció a szuper promoter és az rDNS promotere között történt a λ rif^d 18 DNS képződése során, akkor a szuper promoter már nem került rá a fág DNS-re, így nem képes heparin rezisztens transzkripcióra.

Abból a célból, hogy a probléma megoldásához valamivel közelebb jussunk, egy másik reiniciációt gátló vegyület, a rifampicin alkalmazásával próbálkoztunk meg, melynek hatásmódja a heparinénál sokkal ismertebb.

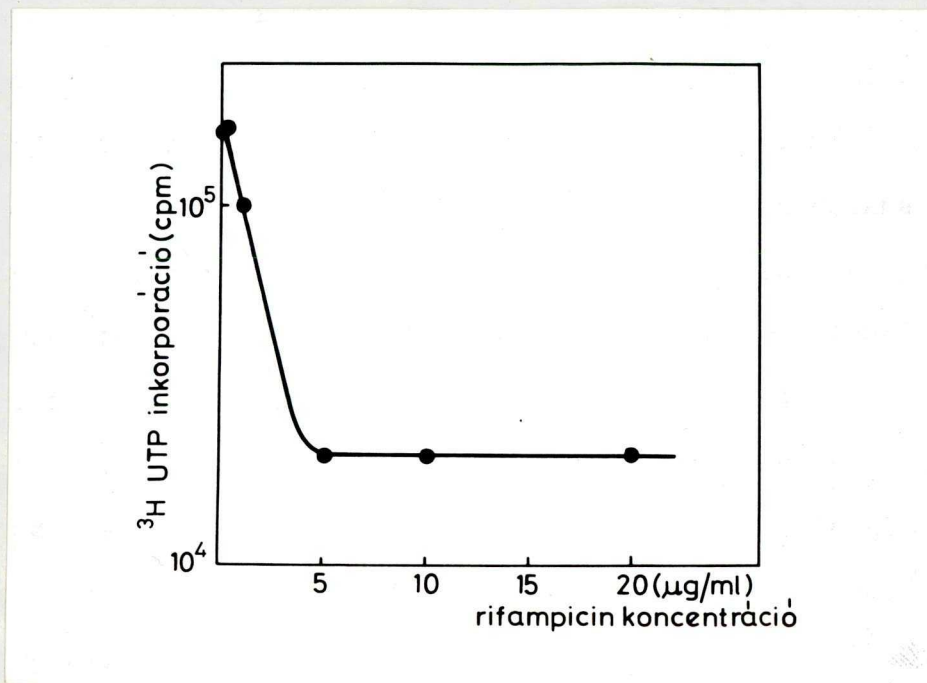
3. rRNS szintézis λ rif^d 18 DNS-en rifampicin jelenlétében

Preferenciális RNS szintézist eredményez, ha egy gén több transzkripciós start ponttal rendelkezik, mint ez pl. T7 DNS-en

ismeretes /81/. A génenkénti iniciációs pontok számát meghatározhatjuk, ha rifampicin jelenlétében végezzük a reakciót, a ribonukleozid-trifoszfátok és rifampicin együttes adásával indítva a transzkripciót. Iniciációs pontonként ugyanis csak egy nyitott polimeráz-promoter komplex található, mely ugyan rifampicin érzékeny, de mivel inaktivációjának sebessége 1/100 része a szabad enzimének és ribonukleozid-trifoszfátok jelenlétében azonnali RNS-lánc iniciációra képes, így látszólag rifampicin rezisztens. Ilyen körülmények között tehát minden start pontról maximálisan egy RNS lánc szintézise kezdődhet meg, melynek befejezése után ledisszociáló polimeráz molekulákat a rifampicin inaktiválja, így azok újabb iniciációban nem vehetnek részt.

A 12. ábrán látható, hogy 5 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin koncentráció kísérleti körülményeink között elegendő a szabad RNS-polimeráz molekulák inaktiválásához. Ezt támasztja alá a 13. ábra is, aminek tanúsága szerint $\lambda_{\text{rif}}^{\text{d}}$ 18 DNS-en 25 perc alatt befejeződik az RNS-láncok szintézise, 5 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin jelenlétében a szintetizált RNS mennyisége ezen idő alatt telítési értéket ér el, ami az adott polimeráz/DNS aránynál kb. 1/8 része a rifampicin nélkül szintetizált RNS mennyiségének.

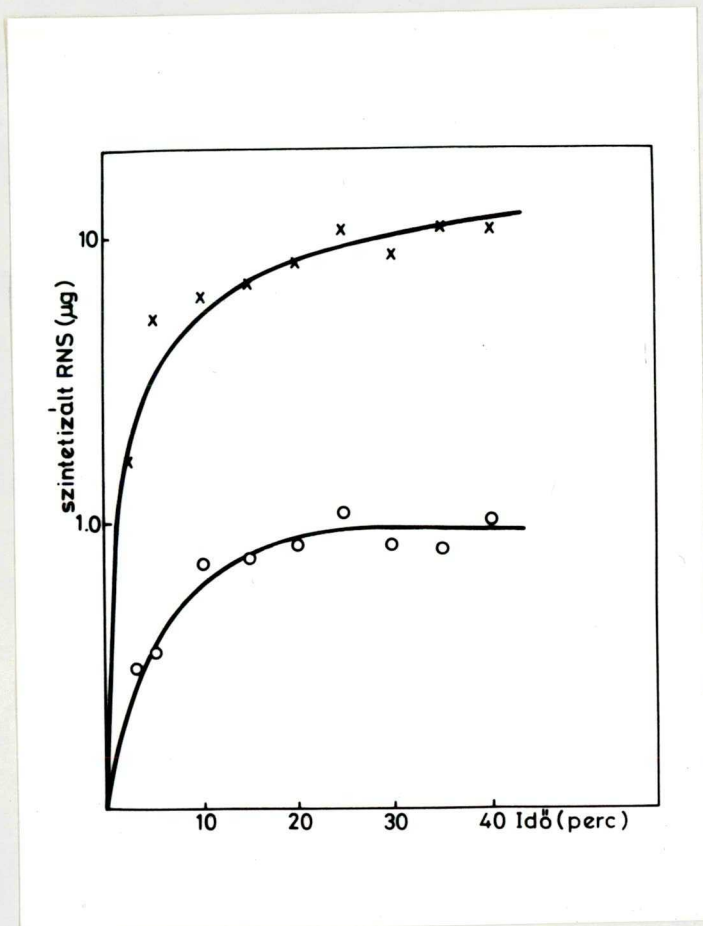
Az 5 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin jelenlétében szintetizált in vitro transzkriptum mennyisége a polimeráz/DNS arány függvényében kezdetben nő, majd kb. 2:1 polimeráz/DNS sulyarányál telítési értéket ér el /14. ábra/. Néhány telítési polimeráz/DNS aránynál szintetizált transzkriptum rRNS tartalmát mutatja a IV. táblázat.



12. ábra

RNS szintézis λ rif^d18 DNS-en a rifampicin koncentráció függvényében

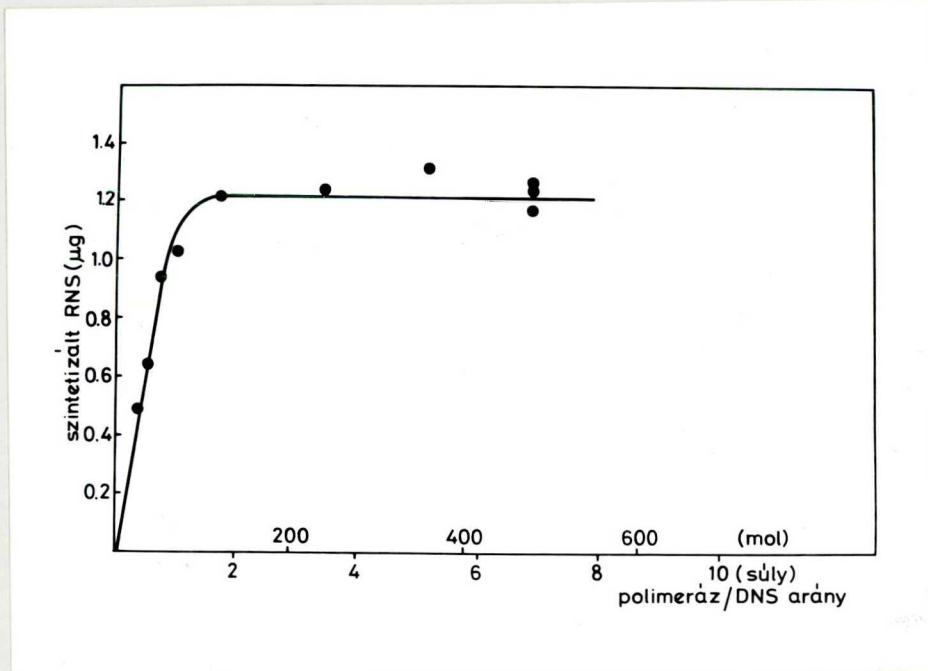
7,25 μ g λ rif^d18 DNS-en 4,48:1 polimeráz/DNS sulyarányánál, 1 mM ATP, GTP, CTP és 50 μ M ³H UTP koncentrációjánál /100 μ Ci/ μ mol/ végeztünk in vitro transzkripciót 25 percig az ábrán feltüntetett rifampicin koncentrációjánál. Az össz RNS szintézist a TCA-s csapadék radioaktivitásának mérésével határoztuk meg.



13. ábra

RNS szintézis λ rif^d 18 DNS-en rifampicin jelenlétében
az idő függvényében

3,788 μ g λ rif^d 18 DNS-en 3,43:1 polimeráz/DNS aránynál végeztünk in vitro transzkripciót 1 mM ATP, CTP, GTP és 50 μ M ³H UTP /2 mCi/ μ mol/ koncentrációnál rifampicin nélkül /x/, ill. 5 μ g/ml rifampicin jelenlétében /o/, az utóbbi esetben a ribonukleozid-trifoszfátok és rifampicin együttes adásával indítva az RNS szintézist. Az ábrán jelzett időpontokban 25 μ l-es aliquotokat BSA jelenlétében 10 % TCA-val kicsaptunk az össz RNS szintézis meghatározása céljából.



14. ábra

RNS szintézis λ rif^d 18 DNS-en rifampicin jelenlétében
a polimeráz/DNS arány függvényében

3,788 μg λ rif^d 18 DNS-en az ábrán feltüntetett polimeráz/DNS arányoknál határoztuk meg az RNS szintézist 25 perc szintézis során 1 mM ATP, GTP, CTP, 50 μM ³H UTP /2 mCi/ μmol / és 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rifampicin koncentrációnál, a TCA-s csapadék radioaktivitásának mérésével.

Látható, hogy még rifampicin jelenlétében is az össz transzkriptum kb. 20 %-a rRNS, ami preferenciális rRNS szintézis mellett szól. Az rRNS/r⁺DNS arány jelentős szórást mutat ugyan, de 1 és 2 között változik és átlag értéke 1,41, ami -

figyelembe véve, hogy a polimeráz molekulák kb. 70-80 %-a képes iniciációra az adott körülmények között /11, 12/ - nagy valószínűséggel 2 iniciációs pontnak felel meg, annál is inkább, mert a DNS esetleges sérülései a kapott értéket csak csökkentik. Így a rifampicin jelenlétében észlelt kedvezményezett rDNS átírás magyarázata az, hogy az rRNS génen két iniciációs pontról indul az RNS szintézis.

Összehasonlításképpen megvizsgáltuk az iniciációs pontok számát *E. coli* DNS rRNS génjein is.

IV. táblázat

rRNS szintézis λ rif^d18 DNS-en rifampicin jelenlétében

polimeráz/DNS /súlyarány/	s z i n t e t i z á l t			$\frac{rRNS}{r^+DNS}$
	össz RNS /ng/	rRNS /ng/	rRNS /%/	
3,43	1100	210,6	19,15	1,11
5,15	1326	278,6	21,01	1,47
6,86	1267	310,0	24,47	1,64
			átlag:	1,41

A reakciókörülmények pontosan megegyeztek a 14. ábránál leírtakkal. Az össz RNS szintézist 25 μ l-es aliquotok radioaktivitásának mérésével, a transzkriptum rRNS tartalmát pedig ³²P rRNS belső standard jelenlétében végzett kompetíciós hibridizációval határoztuk meg.

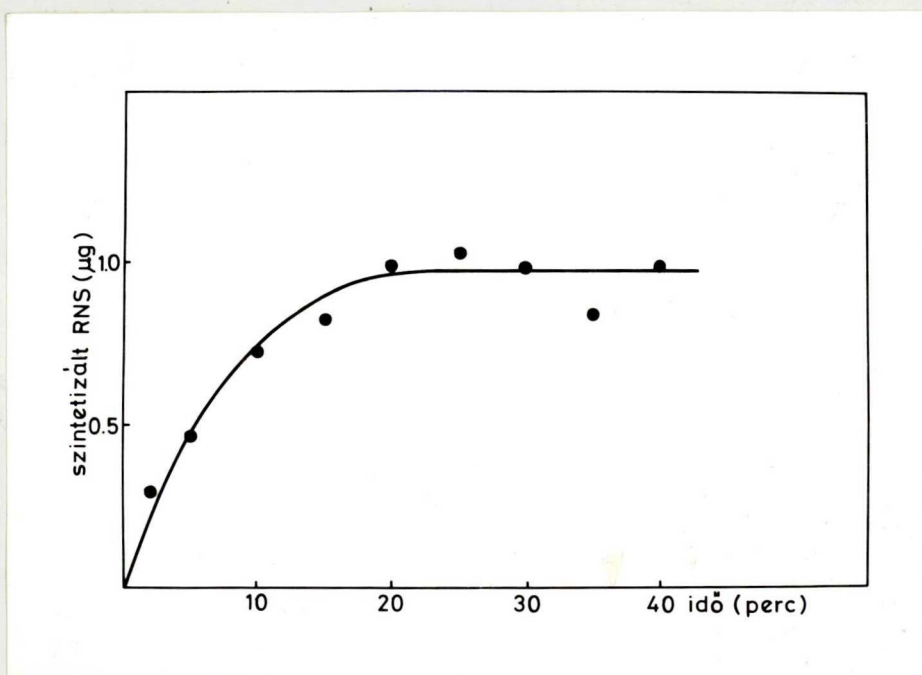
4. rRNS szintézis E. coli DNS-en rifampicin jelenlétében

A 15. ábra tanúsága szerint E. coli DNS-en is kb. 20 perc alatt fejeződik be az RNS-láncok szintézise 5 µg/ml rifampicin koncentrációnál, s ezután a szintetizált RNS mennyisége nem változik tovább. A görbe kezdeti szakasza nem lineáris, éppúgy, ahogy λ rif^d18 DNS-en sem, aminek az a magyarázata, hogy a különböző hosszúságu RNS-láncok terminációja más-más időpillanatban történik. Az RNS szintézis a telítési értéket E. coli DNS-en kb. 5:1 polimeráz/DNS súlyaránynál éri el /16. ábra/.

Telítési polimeráz koncentrációnál 20 perces in vitro transzkripció során nyert RNS-t λ rif^d18 DNS-hez hibridizáltunk kompetitor jelenlétében és anélkül, hogy rRNS tartalmát meghatározzuk.

Mint az V. táblázat adatai mutatják, E. coli DNS-en rifampicin jelenlétében az össz transzkriptumnak csak kb. 2 %-a rRNS, így az csak λ rif^d18 /vagy más rDNS-t transzdukáló fág/ DNS-hez történő kompetitív hibridizációval mutatható ki. A kísérleti eredmények szerint E. coli DNS-en is 2 iniciációs pontot tételezhetünk fel rRNS génekenként, hiszen az rRNS/r⁺DNS arány ez esetben is 1 és 2 közé esik. A rifampicin jelenlétében végzett transzkripció kísérletek alapján tehát úgy tűnik, hogy a λ rif^d18 és az E. coli DNS által hordozott rDNS-ek azonosan működnek. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az E. coli DNS-en kapott kísérleti értékeket óvatosan kell kezelni, mert itt a mérési

módszer hibája nagy. Még 70-80 % hibridizációs efficiencia esetén is a transzkriptumnak csak 2-3 %-a hibridizált λ rif^d 18 DNS-hez, ami az E. coli gének igen nagy számával magyarázható. Bár a kompetíció 50 % körül mozog, ez az alacsony érték a pontos meghatározás szempontjából kedvezőtlen.

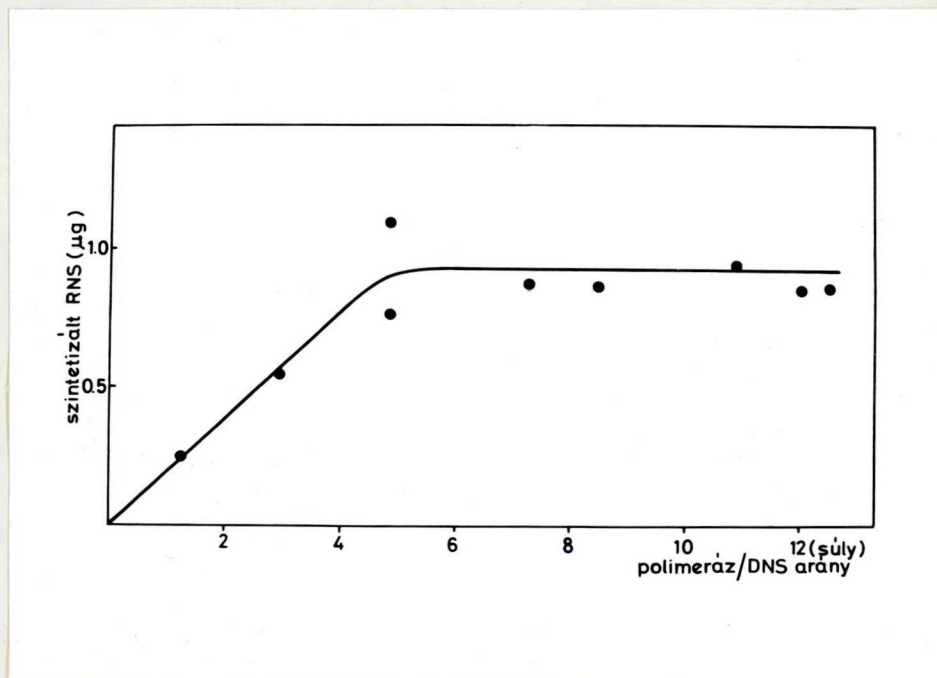


15. ábra

RNS szintézis E. coli DNS-en rifampicin jelenlétében
az idő függvényében

5,35 µg E. coli MRE 600 DNS-en 12,1:1 polimeráz/DNS sulyaránynál végeztünk in vitro RNS szintézist 5 µg/ml rifampicin jelenlétében. Egyéb reakciókörülmények megegyeztek a 13. ábránál leírtakkal.

A kísérleti eredmények alapján úgy tűnik, nem valószínű, hogy az *E. coli* rRNS gének promoterei nagymértékben különböznek egymástól, hiszen a rifampicin jelenlétében végzett transzkripció során nem lehetett különbséget kimutatni a λ rif^d18 és az *E. coli* rDNS-ek között, így valószínűbb, hogy a 2. vagy 3. hipotézis valamelyike igaz. Ez a kérdés azonban ezen kísérleti eredmények alapján nem dönthető el, csak a kérdéses DNS régiók izolálása és szekvenciájának meghatározása adhat felvilágosítást erre a problémára.



16. ábra

RNS szintézis *E. coli* DNS-en rifampicin jelenlétében
a polimeráz/DNS arány függvényében

5,35 µg *E. coli* MRE 600 DNS-en végeztünk in vitro transzkripciót az ábrán feltüntetett polimeráz/DNS arányoknál 37 C^o-on 20 percig 5 µg/ml rifampicin jelenlétében. Egyéb reakciókörülmények azonosak voltak a 14. ábránál leirtakkal.

V. táblázat

rRNS szintézis E. coli DNS-en rifampicin jelenlétében

polimeráz/DNS /súlyarány/	sz i n t e t i z á l t			$\frac{rRNS}{r^+DNS}$
	össz RNS /ng/	rRNS /ng/	rRNS /%/	
5,55	1577,5	30,76	1,95	1,25
7,13	1532,9	27,59	1,80	1,12
7,13	1590,7	33,88	2,13	1,38
7,93	1735,8	30,72	1,77	1,25
9,50	1390,0	42,67	3,07	1,73
			átlag:	1,34

8,2 μ g E. coli HB 1100 DNS-en a feltüntetett polimeráz/DNS arányoknál végeztünk in vitro RNS szintézist. Egyéb reakciókörülmények azonosak voltak a 14. ábránál leirtakkal. Az össz RNS szintézist 25 μ l-es aliquotok radioaktivitásának mérésével, a transzkriptum rRNS tartalmát pedig λ rif^d 18 DNS-hez ³²P rRNS belső standard jelenlétében végzett kompetíciós hibridizációval határoztuk meg.

IV. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteinkben λ rif^d18 DNS templáton vizsgáltuk a riboszomális RNS gén transzkripcióját. Megállapítottuk, hogy a transzdukált rDNS promotere a fágon is működőképes, az in vitro nyert rRNS szintézise túlnyomórészt erről a promoterről indul.

A λ rif^d18 DNS-en in vitro preferenciális rRNS szintézis megy végbe, amit valószínűleg az biztosít, hogy az rDNS promotere olyan - feltehetően többszörös - szerkezetű, mely lehetővé teszi, hogy az már alacsony polimeráz/DNS aránynál telítődjön polimeráz molekulákkal, mikor más gének promotereiről alig indul RNS szintézis. Ezt az elképzelést támasztja alá a rifampicin jelenlétében végzett transzkripció is, melynek segítségével sikerült kimutatni, hogy az rDNS két iniciációs ponttal rendelkezik. A két start pont létezése már eleve preferenciális rRNS szintézist biztosít. Ha iniciációs pontonként néhány polimeráz tároló hely is van az rRNS gén promoterén, amit az E. coli DNS-en heparin jelenlétében végzett kísérletek alapján feltételezhetünk, akkor ez az rRNS szintézis kedvezményezett voltát tovább növeli, figyelembe véve, hogy az RNS-lánc iniciáció igen gyors folyamat és az RNS szintézis sebességlimitáló lépése a templáthoz való kötődés. A rifampicin jelenlétében végzett kísérletek nem adnak felvilágosítást arra a kérdésre, hogy a λ rif^d18 DNS rDNS-én is vannak-e polimeráz tároló helyek, hiszen, mint ismeretes, a DNS-polimeráz komplexek is rifampicin érzéke-

nyek az első internukleotid kötés kialakulása előtt.

A heparin jelenlétében végzett kísérletek tanúsága szerint a transzdukáló fág rDNS-e heparin rezisztens polimeráz tároló helyekkel nem rendelkezik, ami nem zárja ki heparin érzékeny polimeráz tároló helyek létezését. A heparin rezisztencia eltűnése a transzdukált rDNS-en magyarázható azzal, hogy a λ rif^d 18 DNS-re nem került rá valamely, a riboszómális RNS gént megelőző szekvencia részlet, mely valamilyen ok folytán lényeges a heparin rezisztencia szempontjából, vagy azáltal, hogy a promotor "stabilitását" biztosítja, vagy azáltal, hogy ún. heparin rezisztens "szuper promoterként" működik, mely biztosítja az azt követő gén - esetleg gének - heparin rezisztens átírását is. Ennek a kérdésnek az eldöntése azonban további vizsgálatokat követel.

V. I R O D A L O M

1. R.R. Burgess, J. Biol. Chem., 244, 6168-6176 /1969/.
2. R.R. Burgess, A.A. Travers, J.J. Dunn, E.K.F. Bautz, Nature, 221, 43-46 /1969/.
3. W. Zillig, P. Palm, V.S. Sethi, K. Zechel, D. Rabussay, A. Heil, W. Seifert, M. Schachner, Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 35, 47-58 /1970/.
4. G. Gross, D.A. Fields, E.K.F. Bautz, Molec. gen. Genet., 147, 337-341 /1976/.
5. Y. Iwakura, A. Ishihama, T. Yura, Molec. gen. Genet., 121, 181-196 /1973/.
6. E.K.F. Bautz, F.A. Bautz, E. Beck, Molec. gen. Genet., 118, 199-207 /1972/.
7. D.C. Hinkle, M.J. Chamberlin, J. Mol. Biol., 70, 157-185 /1972/.
8. D.C. Hinkle, M.J. Chamberlin, J. Mol. Biol., 70, 187-195 /1972/.
9. D.C. Hinkle, J. Ring, M.J. Chamberlin, J. Mol. Biol., 70, 197-207 /1972/.
10. D.C. Hinkle, W.F. Mangel, M.J. Chamberlin, J. Mol. Biol., 70, 209-220 /1972/.
11. M.J. Chamberlin, J. Ring, J. Mol. Biol., 70, 221-237 /1972/.
12. W.F. Mangel, M.J. Chamberlin, J. Biol. Chem., 249, 2995-3001 /1974/.
13. W.F. Mangel, M.J. Chamberlin, J. Biol. Chem., 249, 3002-3006 /1974/.
14. W.F. Mangel, M.J. Chamberlin, J. Biol. Chem., 249, 3007-3013 /1974/.

15. M.J. Chamberlin, W. Mangel, G. Rhodes, S. Stahl,
Alfred Benzon Symp. IX. "Control of
Ribosome Synthesis" N.O. Kjeldgaard,
O. Maaløe
Munksgaard, Copenhagen /1975/ 22-39.
16. J.L. Darlix, A. Sentenac, A. Ruet, P. Fromageot, Eur. J.
Biochem, 11, 43-48 /1969/.
17. R. Schäfer, W. Zillig, K. Zechel, Eur. J. Biochem., 33,
207-214 /1973/.
18. R. Schäfer, R. Krämer, W. Zillig, H. Cudny, Eur. J.
Biochem., 40, 367-373 /1973/.
19. A.E. Sippel, G.R. Hartman, Eur. J. Biochem., 16, 152-157
/1970/.
20. A.E. Sippel, G. Hartman, Biochim. Biophys. Acta, 157,
218-219 /1968/.
21. D. Maaløe, N.O. Kjeldgaard,
Control of Macromolecular Synthesis,
W.A. Benjamin, New York /1966/.
22. F. Donini, J. Mol. Biol., 72, 553-569 /1972/.
23. S. Spadari, F. Ritossa, J. Mol. Biol., 53, 357-367 /1970/.
24. S.A. Yankofsky, S. Spiegelman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA,
48, 1466-1472 /1962/.
25. A.A. Travers, R.I. Kamen, R.S. Schleif, Nature, 228,
748-751 /1970/.
26. P.P. Dennis, H. Bremer, J. Mol. Biol., 75, 145-159 /1973/.
27. O.L. Miller, B.A. Hankalo, C.A. Thomas, Science, 169,
392-395 /1970/.
28. N.O. Kjeldgaard, K. Gausing,
Ribosomes, M. Nomura, A. Tissieres, P. Lengyel
Cold Spring Harbor Lab. /1974/. 369-392.o.

29. W.A. Haseltine, *Nature*, 235, 329-333 /1972/.
30. D.E. Pettijohn, *Nature New Biol.*, 235, 204-206 /1972/.
31. C. Hussey, J. Pero, R.G. Shorestein, R. Losick, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69, 407-411 /1972/.
32. A. Udvardy, J. Sümegi, P. Venetianer, *Nature*, 249, 548-550, /1974/.
33. J. Sümegi, A. Udvardy, P. Venetianer, *Alfred Benzon Symp. IX. "Control of Ribosome Synthesis"*
N.O. Kjeldgaard, O. Maaløe
Munksgaard, Copenhagen /1975/ 252-265.
34. I. Smith, D. Dubnau, P. Morell, J. Marmur, *J. Mol. Biol.*, 33, 123-140 /1968/.
35. B. Pace, N.R. Pace, *J. Bacteriol.*, 105, 142-149 /1971/.
36. B. Jarry, R. Rosset, *Molec. gen. Genet.*, 113, 43-50 /1971/.
37. N.R. Pace, *Bacteriol. Rev.*, 37, 562-603 /1973/.
38. M.L. Pato, K. von Meyenberg, *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 35, 497 /1970/.
39. W.F. Doolittle, N.R. Pace, *Nature*, 228, 125-129 /1970/.
40. H. Bremer, L. Berry, *Nature New Biol.*, 234, 81-83 /1971/.
41. C.R. Kossman, T.D. Stamato, D.E. Pettijohn, *Nature New Biol.*, 234, 102-104 /1971/.
42. W. Colli, M. Oishi, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 64, 642-649 /1969/.
43. W. Colli, I. Smith, M. Oishi, *J. Mol. Biol.*, 56, 117-127 /1971/.
44. O.L. Miller, Jr. Hamkalo, B.A. Hamkalo, *Int. Rev. Cytol.*, 32, 1 /1972/.

45. L.T. Chow, N. Davidson, *J. Mol. Biol.*, 75, 265-279 /1973/.
46. P.S. Sypherd, D.M. O'Neil, M.M. Taylor, Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol., 34, 77-84 /1969/.
47. M.T. Yu, C.W. Vermeulen, K.C. Atwood, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, 26-31 /1970/.
48. L.S. Birnbaum, S. Kaplan, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 925-929 /1971/.
49. M. Unger, L.S. Birnbaum, S. Kaplan, A. Pfister, *Mol. gen. Genet.*, 119, 377-380 /1972/.
50. B. Jarry, R. Rosset, *Molec. gen. Genet.*, 121, 151-162 /1973/.
51. B. Jarry, R. Rosset, *Molec. gen. Genet.*, 126, 29-35 /1973/.
52. S.R. Jaskunas, M. Nomura, J. Davies, Ribosomes, M. Nomura, A. Tissieres, P. Lengyel, Cold Spr. Harb. Lab. /1974/ 333-368.
53. M. Matsubara, R. Takata, S. Osawa, *Molec. gen. Genet.*, 117, 311-317 /1972/.
54. P. Kindler, T.U. Keil, P.H. Hofschneider, *Mol. Gen. Genet.*, 126, 53-59 /1973/.
55. J.J. Dunn, F.W. Studier, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 3296-3300 /1973/.
56. N. Nikolaev, L. Silengo, D. Schlessinger, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 3361-3365 /1973/.
57. D. Ginsburg, J.A. Steitz, *J. Biol. Chem.*, 250, 5647-5654 /1975/.
58. R.C. Deonier, E. Ohtsubo, H.J. Lee, N. Davidson, *J. Mol. Biol.*, 89, 619-629 /1974/.
59. E. Ohtsubo, L. Soll, R.C. Deonier, H.J. Lee, N. Davidson, *J. Mol. Biol.*, 89, 631-646 /1974/.
60. L. Lindahl, S.R. Jaskunas, P.P. Dennis, M. Nomura, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72, 2743-2747 /1975/.

61. J.B. Kirschbaum, E.B. Konrad, J. Bacteriol., 116, 517-526 /1973/.
62. J.B. Kirschbaum, J. Scaife, Molec. gen. Genet., 132, 193-201 /1974/.
63. S.R. Jaskunas, L. Lindahl, M. Nomura, R.R. Burgess, Nature, 257, 458-462 /1975/.
64. E. Lund, J.E. Dahlberg, L. Lindahl, S.R. Jaskunas, P.P. Denis, M. Nomura, Cell, 7, 165-177 /1976/.
65. B. Konrad, J. Kirschbaum, S. Austin, J. Bacteriol., 116, 511-516 /1973/.
66. J. Collins, N.P. Fiil, P. Jørgensen, J.D. Friesen, Alfred Benzon Symp. IX. "Control of Ribosome Synthesis" N.O. Kjeldgaard, O. Maaløe Munksgaard, Copenhagen /1975/ 356-367.
67. P. Jørgensen, Molec. gen. Genet., 146, 303-307 /1976/.
68. M. Yamamoto, M. Nomura, FEBS Letters, 72, 256-261 /1976/.
69. J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, 319-327.o. Cold Spring Harb. Lab. /1972/.
70. D.E. Pettijohn, K. Clarkson, Ch.R. Kossman, O.G. Stonington, J. Mol. Biol., 52, 281-300 /1970/.
71. M. Gross-Bellard, P. Oudet, P. Chambon, Eur. J. Biochem., 36, 32-38 /1973/.
72. R.R. Burgess, J.J. Jendrisak, Biochemistry, 14, 4634-4638 /1975/.
73. J. Kruh, Methods in Enzymology XII/B, L. Grossman, K. Moldave, Academic Press, New York /1968/ 728-747.
74. D. Gillespie, S. Spiegelman, J. Mol. Biol., 12, 829-842 /1965/.

75. R.A. Lazzarini, L.D. Johnson, *Nature New Biol.*, 243, 17-19 /1973/.
76. G.M. Rubin, *J. Biol. Chem.*, 248, 3860-3875 /1973/.
77. Y. Kano, L. Silengo, F. Imamoto, *Molec. gen. Genet.*, 146, 275-283 /1976/.
78. F.R. Blattner, J.E. Dahlberg, *Nature New Biol.*, 237, 227-232 /1972/.
79. N. Katzir, A. Oppenheim, M. Belfort, A.B. Oppenheim, *Virology*, 74, 324-331 /1976/.
80. R. Willmund, H. Kneser, *Molec. gen. Genet.*, 126, 165-175 /1973/.
81. E.G. Minkley, D. Pribnow, *J. Mol. Biol.*, 77, 255-277 /1973/.
82. J. Saucier, J.C. Wang, *Nature New Biol.*, 239, 167-170 /1972/.
83. W. Szybalski, Uptake of informative molecules by living cells, L. Ledoux, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London /1972/ 59-82.
84. A.C. Peacock, C.W. Dingmann, *Biochemistry*, 7, 668-674 /1968/.
85. A.L. Taylor, C.D. Trotter, *Bacteriol. Rev.*, 36, 504-524 /1972/.