

Az egyszerű szervezetek, mint a prokarioták, három DNS polimerázzal rendelkeznek, amelyeknél a katalizált reakció (ami *in vitro* mérhető), általánosságban ugyanazzal a formulával írható le, mint a fenti ábrán látható. Ugyanez mondható el a vírusok, fágok, sőt az eukariota DNS polimerázok katalitikus reakciójáról is. Közös tulajdonságuk a DNS polimerázoknak, hogy Zn^{2+} iont tartalmaznak (Mildvan és Loeb 1979).

Annak ellenére, hogy a DNS polimeráz reakció ennyire univerzális az élővilágban, az enzimek közt lényeges különbség van, fiziko-kémiai tulajdonságaikban, más fehérjékhez, enzimekhez való kapcsolatukban, ami sejten belüli szerepüket is meghatározza.

Az emlős DNS polimerázok

Hasonlóan a baktériumokhoz, az emlős sejtek is többfajta DNS polimerázzal rendelkeznek. Ezek száma és elnevezése nagyon változó volt 1975-ig, amikor az enzimekkel foglalkozó munkacsoportok egységes nomenklatúrát javasoltak, amit ma is használunk (Weissbach et al, 1975- Weissbach 1977), újabb kiegészítéssel. Az emlős sejtek három fő DNS polimerázzal rendelkeznek, amelyeket a felfedezésük sorrendjében α , β és γ DNS polimeráznak neveztek el. Az utóbbi 2—3 évben timuszban és csontvelősejtekben egy negyedik DNS polimerázt is találtak, amit δ polimeráznak neveznek.

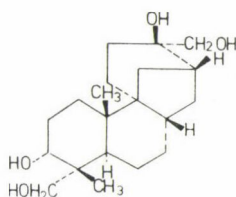
Az egyes polimerázok DNS replikációban betöltött szerepét prokariótákban a DNS polimeráz hiány mutánsok segítségével tisztázták. Emlős sejtekben ilyen hiány mutánsokkal nem rendelkezünk, ezért a funkció tisztázását más úton kellett megközelíteni. A DNS replikáció az eukariótákban a sejtciklusnak csak egy rövid, meghatározott részében, az S fázisban zajlik. Ebben a fázisban a DNS szintézis a genom több részén egyszerre folyik, mintegy 10^4 replikon működhet egyszerre egy sejtben. Ezek „bekapcsolása” szigorúan meghatározott sorrendben történik. A replikonokban a DNS rövid fragmentumokban szintetizálódik (Okazaki fragmentumok), amelyek egy része 5—15 egységből álló RNS oligonukleotid szakaszokkal kezdődik. A három DNS polimeráz közül a nagy molekulásúlyú ($2-5 \times 10^5$) α polimeráz mennyisége párhuzamosan változik a DNS szintézis intenzitásával, míg a kis molekulásúlyú ($3-5 \times 10^4$) β polimeráz aktivitása állandó a G_1 és S fázisú sejtekben. Az egyes polimerázokkal szemben kifejlesztett specifikus inhibitorok, valamint az enzimek aktivitásának a változása a sejtciklus alatt vittek közelebb az enzimek funkciójának megismeréséhez.

α DNS polimeráz

Osztódó sejtekben, proliferáló szövetekben ennek a polimeráznak a legnagyobb az aktivitása. Szinkronizált HeLa sejttenyészetekben aktivitása tízszeresére nő a G_1 –S fázis átalakulás alatt (Spadari és Weissbach 1974), mitogénnel stimulált vér (Tyrsted, G. és Munch Petersen, 1977) és tonsilla lymphocytákban (Staub és mt. 1976) is az α polimeráz aktivitása nő 5–6-szorosan.

Az enzimet specifikusan gátolja egy tetraciklikus diterpén, az aphidicolin (cephalosporium aphidicola terméke), képletét mutatja a 2. ábra. Izolált sejtmagok, SV40 vírus replikációs komplexének DNS szintézisét csak aphidicolinnal lehetett gátolni, nem gátolták a dNTP-k inkorporációját a dideoxi-nukleozid trifoszfát analógok (ddNTP-k), amelyek a β polimeráz gátlószerei.

Az α polimeráznak a DNS replikációban betöltött szerepét támasztotta alá az enzimnek az a képessége is, hogy RNS primert tud használni a katalizált reakcióban (Spadari és Weissbach 1975). Ennek az enzimnek a polimerizációs sebessége (30 nukleotid/sec) közelíti meg a kromoszóma replikonokban a replikációs villa haladási sebességét (50–60 nukleotid/sec). A HeLa sejt teljes genomjának (3×10^9 bázispár) replikációja $1,5 \times 10^5$ nukleotid/sec polimerizációs sebességet feltételez, amit biztosítani tud a sejtben levő 6×10^4 molekula α DNS polimeráz. A különböző DNS polimerázok számát, polimerizációs sebességét és funkcióját mutatja be az I. táblázat (Weissbach 1979).



2. ábra. Az α DNS polimeráz specifikus gátlószere az aphidicolin

I. táblázat

Emlős DNS polimerázok

DNS polimerázok	Molekulák száma a sejtben	Polimerizáció sebessége	Funkció
α	6×10^4	30 nukl/sec	Replikációs DNS szintézis RNS primerrel
β	7×10^4	2,5 nukl/sec	Repair, lánc hosszabbítás
γ	4×10^4	4,0 nukl/sec	mitochondrium, adenovírus DNS szintézise (standard displacement)
δ	—	—	5' – 3' exonukleáz aktivitás miatt a replikáció hűségéért lehet felelős

A DNS replikáció rendkívül komplex folyamat, a DNS polimerázokon kívül számos más funkciójú fehérjére is szükség van. *E. coli*-ban eddig hús fehérjéről bizonyították, hogy résztvesznek a DNS replikációban, ezek közül három fehérje rendelkezik DNS polimeráz aktivitással. Kevesebbet tudunk az emlősök replikációs fehérjéről, de kimutatták, hogy a replikációs α DNS polimeráz aktivitását itt is befolyásolják az ún. „hélix destabilizáló” fehérjék, az RNS primer szintéziséért felelős enzim (primase) stb.

Csirke embrióban egy speciális protein kinázt is leírtak, amelyik fokozza az α polimeráz aktivitását (Danse 1981).

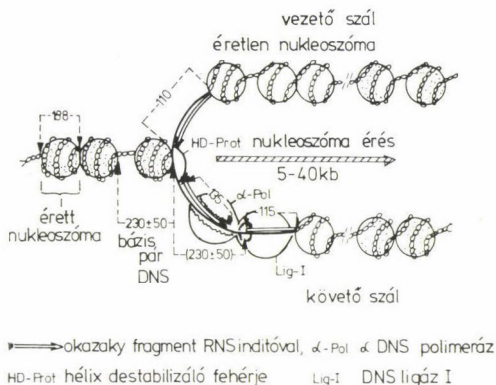
Az enzim lehetséges regulációja szempontjából említésre méltó a di-adenozin tetrafoszfát (Ap4A), amely az α polimeráz egyik alegységéhez kötődik. A di-adenozin tetrafoszfát sejtenbelüli koncentrációja a DNS szintézissel párhuzamosan változik, az S-fázis elején nő (Grummt 1980).

Az α DNS polimeráz negyedleges szerkezetéről még nem alakult ki egy-egy kép az irodalomban. Az eddigi adatok arra mutatnak, hogy az enzim több alegységből épül fel.

Sok vita forrása volt az α DNS polimeráz lokalizációja a sejtben. Hosszú ideig csak a citoplazmában tudták kimutatni, majd vízmentes közegben preparált sejt magokban is sikerült α polimeráz aktivitást mérni.

A legutolsó adatok szerint, indirekt immun-fluoreszcenciával, az α DNS polimeráz legnagyobb részét a perinukleáris zónában találták főtálas borjú fibroblasztokban (Brown 1981), a magban ezzel a módszerrel nem találtak enzimet. A szerzők feltételezik, hogy a perinukleáris α DNS polimeráz tagja annak a „multienzim komplexnek”, amely képes elvégezni a nukleotidok redukcióját, foszforilációját és polimerizációját, a DNS replikáció számára speciális „metabolikus csatornát” képezve a sejtmag—citoplazma határon (Reddy és Pardee 1980).

Néhány emlős sejtéből az α polimerázt homogén állapotig megtisztították. Egyik esetben sem tendelkezik az enzim nukleáz aktivitással, szemben a bakteriális polimerázzal. Az α polimeráz aktivitását minden SH blokkoló reagens gátolja. Tisztított humán α polimeráz tulajdonságait, reakciómechanizmusát Korn és mtsai (1981) tanulmányozták részletesen. Szerintük az enzimen két nagy affinitású kötőhely van az egyszálú DNS templát és ugyanannyi a primer számára. A nagy affinitású enzim-nukleinsav kölcsönhatásnak szerepe lehet a specifikus start és stop helyek felismerésében. KB sejtekből izolált α polimeráz „processzív reakció” mechanizmusának tanulmányozása (Fisher és Korn 1981a, b) azt mutatta, hogy az enzim először a templátot, majd a primert és végül a dNTP-eket köti. Az enzim a templátról csak 15–30 nukleotid összekapcsolása után disszociál le. Ezt a disszociációt fokozzák a poliaminok, PPI és az új lánc hossza (Detera 1981). A hélix destabilizáló fehérjék csökkentik az enzim disszociációját a templátról és hosszabb láncok keletkeznek a jelenlétükben.



3. ábra. A replikációs villa az eukarióta kromozómán az α DNS polimerázzal

Összefoglalva az α DNS polimeráz a replikációért felelős enzim az eukariótákban, baktériumokban ezt a funkciót a DNS polimeráz III tölti be. A kromoszóma replikációban, a replikációs villában az α DNS polimerázt mutatja be a 3. ábra. A kromatinban a kettős szálú DNS nukleoszómákká rendeződve foglal helyet, a „nukleoszóma core” köré feltekerve hozza létre a kromatin jellemző elektronmikroszkópos, gyöngyfüzérre emlékeztető képét.

A nukleoszóma „core” partikulákat a $(H2A)_2 (H2B)_2 (H3)_2 (H4)_2$ hisztonokból álló szimmetrikus szerkezetű oktamer hozza létre. (Mirzabekov 1981). A nagyobb molekulásúlyú H1 hiszton a nukleoszóma partikulák között foglal helyet (az ábrán nem látható). Emlős sejtekben a DNS szintézissel párhuzamosan halad a hisztonok szintézise, az új DNS azonnal nukleoszómákká rendeződik az új hiszton molekulákkal, mint ez a 3. ábrán is látható. A nukleoszóma szerkezet csak rövid szakaszokon, a replikációs villa közelében szűnik meg a replikációt iniciáló (nincs ábrázolva) és a hélix destabilizáló (HD-fehérje) fehérjék hatására. Megszintetizálódik az RNS indító, (feltehetően egy DNS függő RNS polimeráz „pimase” segítségével, amely nem azonos a transzkriptációs RNS polimerázokkal), amelyhez az α DNS polimeráz dNTP-eket kapcsol, a szülői DNS-nek megfelelő sorrendben és elkészülnek az ún. naszcens DNS (vagy Okazaki) fragmentumok. Ezeknek az összekapcsolását a DNS ligázok (Lig I) végzik. A vezető szálon” indul meg a szintézis, ezért ott a nukleoszóma érés előbbre halad, mint a „követő szálon” (De Pamphilis és Wassarman 1980).

β DNS polimeráz

A sejt ciklus alatt az aktivitása állandó. Osztódó sejtekben az összes DNS polimeráz aktivitás kb. 1/10-ét teszi ki a β polimeráz. Molekulásúlya $3-5 \times 10^4$, bázikus fehérje, minden sejtben szorosan kötődik a kromatinhoz,

csak magas só koncentrációval extrahálható a sejt magokból. Hasonlóan az α polimerázhoz nincs nukleáz aktivitása, SH blokkolókkal, aphidicolinnal nem gátlható és kevésbé érzékeny az arabinozil-nukleotidokkal szemben, mint az α enzim. Aktivitását erősen gátolják a 2', 3'-dideoxinukleotid analógok (2. táblázat).

2. táblázat

Szelektív DNS polimeráz inhibitorok

	α	β	γ	δ
aphidikolin	+++	-	-	+++
NEM	++	-	+	+++
ara-CTP	+++	-	-	+++
dd-TTP	-	+++	+++	--

A β DNS polimeráz, a DNS templáton az egyszálú DNS szakaszok teljes hosszát lemásolja, az új DNS szakaszok hosszabbak, mint az α polimeráz esetében (Korn 1981).

Abban az esetben, ha templátként ún. „aktivált” DNS-t használnak, a β polimeráz teljesen kitölti az aktivált DNS-en a „hiányokat” (gap-eket), amelyeket az „aktiválás” során DNáz kezeléssel, mesterségesen állítottunk elő. A β polimeráz egy-egy processzív ciklus alatt (míg az enzim nem disszociál le a templát DNS-ről) több nukleotidot kapcsol össze, mint az α polimeráz, kikölti mindig a teljes gap-et. Az enzimnek ez a tulajdonsága hívta fel a figyelmet a DNS javító mechanizmusokban betöltött szerepére. A DNS károsítókat (alkiláló szerek, UV-, rtg- és gamma besugárzás, kémiai mutagének stb.) a sejt úgy javítja ki, az esetek többségében, hogy specifikus nukleázok kivágják a hibás DNS szakaszt és ennek nyomán keletkeznek hiányok, gap-ek, ezeket képes pótolni a β DNS polimeráz az in vitro kísérletek tanulsága szerint. Az in vivo kísérletek egyes esetekben alátámasztották a β polimeráz szerepét a DNS repairban (Pedrali 1974), míg mások UV besugárzás után nem találtak β polimeráz aktivitás növekedést (Wicker 1979). Bleomycinnel okozott DNS törések kijavításában eléggé meggyőzően bizonyítottnak látszik a β polimeráz szerepe (Coetzee 1978, Castellot 1978). Kémiai carcinogen kezelés után β polimeráz aktivitás növekedést találtak májban (Kaufman 1979), valamint vírussal indukált hepatomában (Staub és mtsai 1982). Egy sor kémiai carcinogén in vitro, elsősorban az α polimeráz aktivitását gátolja patkány máj polimerázok esetében (Chan és Becker 1981).

Mai ismereteink szerint nem zárható ki, hogy a DNS polimeráz β a replikációs DNS szintézisben is részt vesz a lánc elangációban, valamint az sem hogy az α polimeráz is működhet a DNS repairban. Úgy látszik, hogy bizonyos

funkciókban helyettesíthetik egymást a DNS polimerázok, míg másokban nem. Így a β polimeráz nem helyettesítheti az α polimerázt a nascens DNS fragmentek iniciálásába. A prokariotákban a β DNS polimerázhoz hasonló funkciót tölt be a DNS polimeráz I, óriási különbség a két enzim között, hogy az utóbbi kétféle exonukleáz aktivitással is rendelkezik, amelyeknek a szerepe bizonyított a javító funkcióban.

γ DNS polimeráz

Az emlős sejtekben a mitochondriumok is tartalmaznak DNS polimerázt, amit hosszú időn keresztül mitochondriális (mt) polimeráznak neveztek és elválasztották az α és β polimeráztól. Az mt DNS polimerázon kívül egy negyedik enzimet is találtak, amely kb. 1%-át teszi ki az összes DNS polimeráz aktivitásnak, ezt nevezték γ DNS polimeráznak. Ez utóbbi enzim molekulasúlya az α polimerázhoz áll közel. Legjellemzőbb tulajdonsága volt, hogy in vitro körülmények között szintetikus ribo-oligonukleotid (pl. poli(rA)oligo-(dT)₁₂) templátról DNS másolatot tudott készíteni in vitro körülmények között.

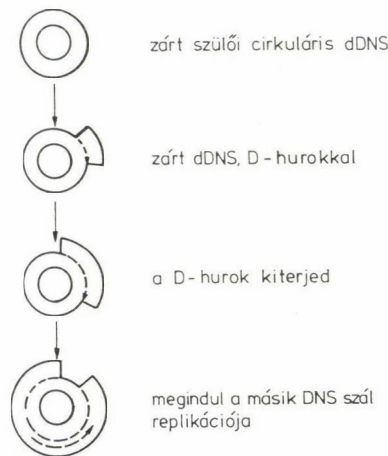
Ez a tulajdonság hasonlóná tette az onkogén RNS vírusokra jellemző reverz transzkriptázhoz, amely a vírus RNS-ről, dNTP-k jelenlétében DNS másolatot készít. Hosszú ideig azt hitték, hogy az emlős γ DNS polimeráz azonos valamely RNS vírus reverz transzkriptázával, ezt azonban a katalizált reakció in vitro templát affinitásán kívül semmi nem támasztotta alá. Ma már tudjuk, hogy a DNS polimerázok templátok iránti affinitását a környezet, a jelenlevő egyéb fehérjék, bázikus anyagok stb. erősen befolyásolják. Az utóbbi években pl. kimutatták, hogy bizonyos körülmények között a β DNS polimeráz affinitása nagyobb a szintetikus poliribonukleotid templát iránt, mint a γ polimerázé (Yamaguchi és mtsai 1980), tehát a γ polimeráz nem valódi RNS függő DNS polimeráz, mint azt még néhány évvel ezelőtt hitték (Weissbach A. 1975). Azóta kiderült, hogy a γ DNS polimeráz azonos a mitochondriumok DNS polimerázával (Bolden 1977; De Pamphilis és Wasserman 1980). A sejtben, a mitochondriumban és a sejtmagban is kimutatható.

A γ DNS polimeráz inhibitor érzékenységét mutatja a 2. táblázat, látható, hogy az enzim különlegesen érzékeny ddNTP analógokra. Ennek segítségével derült fény arra, hogy a γ polimeráz nemcsak a mitochondriális DNS szintéziséért felelős, hanem a sejtmagban, segítségével duplázódik az Adenovírus (Ad5 és Ad2 is; Van der Vliet és Kwant 1981).

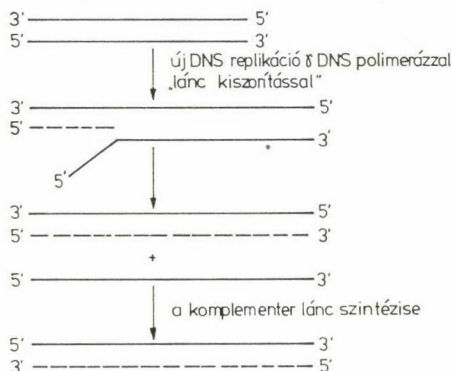
Mint tudjuk emlős sejtekben, ugyanúgy mint prokariotákban a DNS ún. szemikonzervatív módon duplázódik, azaz mindkét szülői DNS szálon a másolás egyszerre történik ellentétes irányban. A két DNS szál villa alakban szétnyílik.

Széttekerő fehérjék, hélixdestabilizáló fehérjék stb. hatására (Bánfalvi és mtsai) helyet biztosítva a replikáció iniciálását, a másolást, a lánc elongációt végző enzimek számára (polimerázok). A szétnyílt DNS láncok hozzák létre az ún. replikációs villát, ami autoradiográfiával jól követhető, hogyan halad végig a szülői kettős szálú DNS molekulán (3. ábra). Mitochondriumokban és az adenovírusok esetében a DNS replikáció nem a szemikonzervatív mechanizmussal történik, hanem az ún. „strand displacement” (lánc kiszorítás) mechanizmussal. Ennek lényege, hogy a DNS replikáció aszimmetrikusan folyik, előbb csak az egyik szál duplázódik meg, majd ezt követi a másik DNS szál duplázódása. A „strand displacement” replikációt a mitochondrium DNS esetében és a sejtmagban az adenovírus DNS esetében is γ polimeráz végzi. A γ polimerázról kimutatták, hogy valamennyi DNS polimeráz közül a leghosszabb szakaszokat szintetizálja, mielőtt ledisszociál a templátról „legprocesz-szívebb”. A mitochondrium DNS kettős szálú cirkuláris molekula (kb. 10 000 nukleotidból áll), ahol először a belső gyűrűt használja mintának a γ polimeráz, majd annak csaknem teljes replikációja után (75—79%) kezdi el a külső DNS gyűrű másolását (Weissbach 1979) (4. ábra).

Az Adenovírus lineáris duplaszálú DNS-t (Ad-DNS) tartalmaz, amely kb. 30 000 nukleotidból áll és fertőzés után a gazdasejt magjában replikálódik. A replikációs komplexeket izolálták, kérdés volt, hogy az α vagy γ DNS polimeráz készíti-e az Ad-DNS-t. A vírus DNS replikációt di-dezoxi-ribonukleozid trifoszfátok teljesen leállították, ami a γ polimeráz jelenlétére utalt, míg aphidicolin nem gátolta a folyamatot. Az Ad-DNS replikációs komplexből azóta izolálták és identifikálták is a γ DNS polimerázt, amely tulajdonságaiban azonos a mitochondrium DNS-t replikáló enzimmal (Van der Vliet és Kwant 1981). Ki kell hangsúlyozni, hogy nem minden DNS vírus, amely a gazdasejt



4. ábra. A mitochondriális DNS replikációja a γ DNS polimerázzal (Weissbach 1979)



5. ábra. Az adenovírus replikációja γ DNS polimerázzal (Winnacker 1978)

magban replikálódik, szaporodása történik a „strand displacement” mechanizmussal (5. ábra), a γ DNS polimeráz segítségével. Az SV-40 DNS vírus is a magban szaporodik, de annak replikációjában az α DNS polimeráz vesz részt, szaporodását gátolja az aphidicolin.

A magi γ DNS polimeráz szerepe a normál replikációs folyamatban nem ismert, nem valószínű, hogy egy esetleges adeno-vírus fertőzésre várva van a sejtben.

A „láncciszorítás” mechanizmussal történő DNS replikációt sem mutattak ki eddig az emlős sejtekben. Kimutattak azonban egyszálú DNS régiókat (ssDNS) humán sejtmagokban, amelyeknek a szerepe szintén ismeretlen, Weissbach (1979) feltételezi, hogy ezek az egyszálú DNS szakaszok, meghatározott génekről a γ DNS polimeráz segítségével, a „standard displacement” mechanizmussal készült másolatok. Ezen az úton egy-egy speciális funkció ellátására egy génről több másolat is készülhet, a gén amplifikálódik, anélkül, hogy az egész genom megduplázódna. A limfociták által a tápfolyadékba leadott kis molekulású DNS egyik lehetséges funkciójául szintén speciális immun-gének amplifikációt feltételezték (Rogers 1976).

δ DNS polimeráz

A bakteriális DNS polimerázokkal ellentétben az eddig tárgyalt emlős DNS polimerázok nem rendelkeznek exonukleáz aktivitással. A bakteriális DNS polimeráz I és III 3'—5' exonukleáz aktivitásáról bizonyították, hogy a replikáció pontosságáért felelős, hibás, nem a mintának megfelelő nukleotid beépítése esetén azt azonnal kimetszi („hiba javító” nukleáz).

Az utóbbi években alacsonyabbrendű eukariotákban (Chang 1977) és emlős sejtekben is izoláltak 3'—5' exonukleáz aktivitással rendelkező DNS.

polimerázokat. Csontvelő sejtekből és timuszból az α , β és γ DNS polimerázok mellett kimutattak és tisztítottak egy negyedik DNS polimerázot, amelyik legjobban az α polimerázhoz hasonlít, SH reagensekkel szemben azonban tízszer érzékenyebb (lásd gátolhatóságát a 2. táblázatban).

Ellentétben az α polimerázzal 3'—5' exonukleáz aktivitással is rendelkezik. Feltételezik, hogy a nukleáz aktivitásra ebben az esetben is a hibátlan DNS replikációhoz van szükség (Lee 1981).

Terminális dezoxinukleotid transzferáz (TdT)

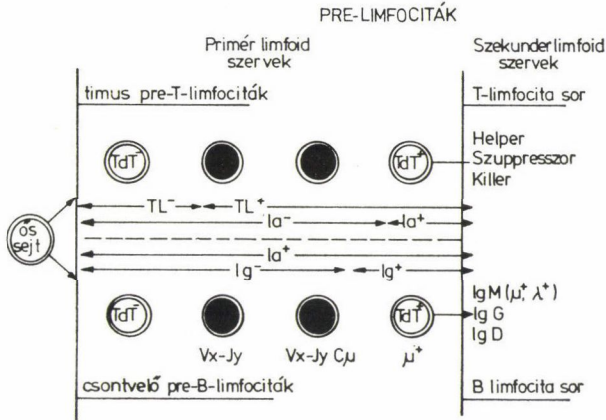
A DNS polimerázok között különleges helyet foglal el, a katalizált reakció és a szövet specifikitása miatt. A terminális dezoxinukleotid transzferáz, hasonlóan a többi DNS polimerázhoz dNTP-k, Mg^{2+} ion és 3'OH véggel rendelkező DNS vagy oligonukleotid jelenlétében foszfodiészter kötésekkel kapcsolja össze a dNTP-eket, miközben PPI szabadul fel. A nukleotidok polimerizációjához *nincs szükség templát DNS-re*. Az enzimet 1964-ben Bollum írta le borjú timuszban (Bollum 1964) és bizonyította, hogy az enzim nem azonos a polinukleotid foszforilázzal.

A TdT-re a figyelmet az első DNS rekombinációs kísérletek hívták fel (Jakson 1972). A TdT-vel komplementer polinukleotid végeket szintetizáltak, az összekapcsolásra kijelölt különböző speciosekből származó DNS fragmentekre (génekre). A komplementer egyszálú DNS végek tették lehetővé, hogy a kijelölt gént hozzá kapcsolják a hordozó (vektor) DNS-hez. Az enzim a DNS rekombinációs technológia (génebézés) ma is egyik legfontosabb eszköze, különösen, amikor in vitro, biokémiai módszerekkel szintetizált gént akarunk valamilyen célból bevinni más organizmusba.

A terminális dezoxinukleotid transzferáz „újra felfedezésének” másik dátuma 1973, amikor McCaffery (és mtsai) egy akut limfoblasztos leukémiában szenvedő beteg fehérvérsejtjeiben nagyon magas TdT aktivitást talált.

Hamarosan kiderült, hogy az enzim csak *limfoid sejtekben* fordul elő. A limfoid rendszer szerteágazó funkciójú sejtjei közül TdT aktivitást csak a differenciálatlan limfocitákban tudtak kimutatni. A TdT⁺ sejteket immunfluoreszcencia módszerrel, borjú timuszból tisztított, homogén enzimmel szemben termeltetett anti-TdT immunglobulinok segítségével mutatják ki. A módszer szerint a timuszban főleg a kortikális limfociták tartalmaznak TdT-t (összes sejt 65%-a), a csontvelőben a sejtek 1—5%-a bizonyult TdT⁺-nak. A timuszon és a csontvelőn kívül más limfoid szervekben nem találtak TdT-t tartalmazó sejtet. A limfocita differenciálódása során a TdT sejtek és egyéb limfocita differenciálódási markerek változását mutatja a 6. ábra.

Látható, hogy TdT⁺ sejtek csak primér immun szervekben, a timuszban és a csontvelőben vannak (Bollum 1981), ahol az immunopoezis és hemopoezis



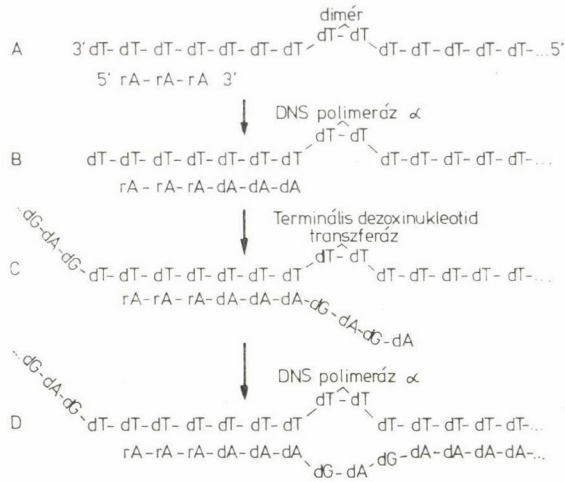
6. ábra. A T és B limfociták differenciálódása, a TdT⁺ sejtek megjelenése (Bollum 1981)

zajlik. Bollum immunfluoreszcenciás adatai szerint a pre-B limfociták is tartalmaznak TdT-t (Bollum F. J. 1979). Az enzim megjelenését, illetve eltűnését egyéb differenciálódási markerek megjelenése, ill. eltűnése kíséri (6. ábra). A TdT pozitív sejtek számának, illetve az enzim aktivitásának mérését, ma a leukémiák differenciál diagnosztikájában alkalmazzák. Különösen jelentős a granuloid leukémiák krízisében annak eldöntése, hogy myeloblasztos vagy limfoblasztos krízissel állunk-e szembe. A TdT aktivitás megjelenése a limfoblasztos krízis mellett szól, ami az alkalmazott terápiát is meghatározza. Klinikai használatra a TdT jelenlétének mérésére enzimkit-ek vannak már kereskedelmi forgalomban.

A terminális transzferáz a génátvitel egyik fontos eszköze, marker enzim a leukémiák és limfomák differenciál diagnosztikájában, de még ma is homály fedi a sejten felüli funkciót. Számos spekuláció született az enzim lehetséges szerepéről, ezek közül kettőt mutatok be.

A DNS replikáció enzimeiről mind a baktériumokban, mind az eukariotákban kimutatták, hogy nem, vagy rosszul működnek hibás templát jelenlétében. A DNS polimeráz α in vitro aktivitása jelentősen csökken, ha a minta DNS-ben timin-diméereket hoztak létre UV besugárzással (Yoshida S. és mtsai 1981). Ezt az aktivitás csökkenést terminális transzferáz adásával ki lehetett küszöbölni. A szerzők feltételezik, hogy a terminális transzferáz a hiba helyén, templáttól független dezoxiligonukleotid részt készít, segítve ezzel az α polimeráz a DNS mintában levő hiba „kikerülésére” (by pass). A DNS polimeráz és a terminális dezoxiribonukleotid transzferáz lehetséges együttműködését mutatja a 7. ábra.

A két enzim „kooperációja” nem ad magyarázatot a terminális transzferáz szigorú szövet specifikására, mivel a hatás nemcsak limfoid sejtekből származó α DNS polimeráz esetében figyelhető meg.

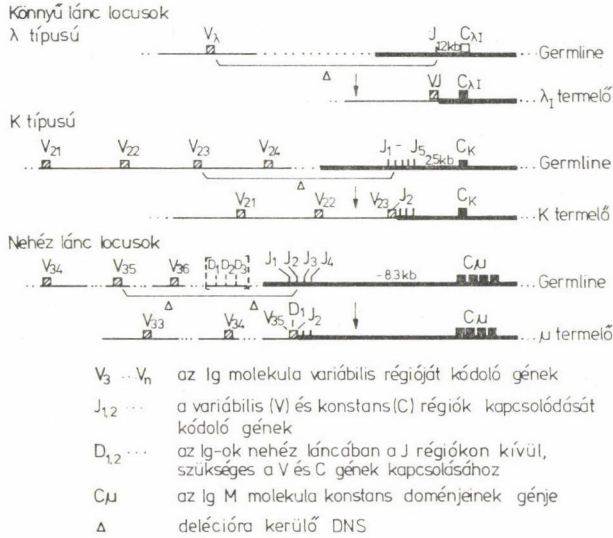


7. ábra. A terminális dezoxinukleotid transzferáz lehetséges szerepe a DNS repairben (Yoshida 1981)

Az immunrendszer egyedülálló, legtöbbet vizsgált és napjainkig sem megoldott funkciója, az a képessége, hogy az antigének sokaságára más-más fehérje szintézisével képes válaszolni. Az immunológiai diverzitás magyarázatára legáltalánosabban a „germ-line” teóriát fogadják el, tankönyvi adatként tárgyalják, amelynek lényege, hogy minden lehetséges antigénre válaszolni képes limfocita, preformáltan jelen van a szervezetben, az ingerre a kijelölt limfocita elszaporodik és termeli az ellenanyagot. A teória azonban nem ad választ egy sor problémára, ezért újabb és újabb teóriák látnak napvilágot szinte évenként. A terminális transzferáz abszolút limfoid specifitásának leírása után D. Baltimore (1974) az immunválasz diverzitásában fontos szerepet tételezett fel ennek az enzimnek.

Az enzim templáttól függetlenül épít be dNTP-eket a DNS-be, mutációkat új információt hordozó szekvenciákat hozhat így létre, ami molekuláris alapja lehet az antigénre adott gyors válasznak, a szomatikus szinten létrejött diverzitásnak, molekuláris kulcsát adva a szomatikus mutációs teóriának. Az immunválasz realizálásához, az immunglobulinok szintéziséhez még egy sor más enzim is szükséges, ezeket napjainkig sem sikerült kimutatni, az elképzelést nem sikerült továbbfejleszteni.

A 6. ábrán azt láthattuk, hogy a TdT jelen van a pre-T és pre-B limfocitákban egyaránt, amelyek egymástól felületi markerek alapján különíthetők el (lásd TL antigén, Ia antigének stb.). A limfociták érése során ezekből a sejtekből alakulnak ki az érett T és B limfociták (helper, szupresszor, killer T limfociták és immunglobulint termelő B limfociták), amelyek már nem tartalmazzák a TdT-t. Az elmúlt években vált ismertté, hogy a limfociták differen-



8. ábra. Az aktív immunglobulin könnyű és nehéz lánc gének kialakulása a limfociták differenciálódása során (Adams 1980)

ciálódása során azon idő alatt, amikor a sejtek még TdT-t tartalmaznak a DNS „átrendezésén” (rearrangement, gene conversion) megy át, az immunglobulinok variábilis (v) és konstans (c) régióit kódoló DNS szakaszok egymáshoz közelebb kerülnek a genomban, V—J—C_μ gének kiválasztása és egymás mellé illesztése zajlik a differenciálódás során (8. ábra), nemcsak a pre-B, hanem a pre-T limfocitákban (Molgaard 1980, Adams 1980) is.

Ezeket az eseményeket a kettős szálú, folyamatos DNS szál specifikus hasítása és új szakaszok illesztése, kapcsolása kell hogy kísérje, ami feltehetően átmenetileg szabad 3'OH-DNS végeket is eredményez. Ehhez a DNS végéhez tud a TdT nukleotidokat kapcsolni megváltoztatva ezzel a genomot. Az enzim szerepére a differenciálódásban Dosch és mtsai (1980) megfigyelése utal, amely szerint dezoxi-guanozin (dG) gátolta a szupresszor T limfociták kialakulását. Immunizálás során, valamint sejt kultúrákban a TdT⁺ sejteket a dG elpusztította, még a TdT⁻ sejtekre semmilyen hatással nem volt. A hatás oka feltehetően az, hogy a terminális transzferáz a DNS-ben a 3'OH végekhez dGMP-t polimerizál, amit a sejt nem tud kiküszöbölni (Bollum 1981). Mindezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a terminális transzferáz a limfocita differenciálódás során lejátszódó DNS átrendeződésében játszhat szerepet (Bollum 1981).

A borjútimuszból tisztított terminális transzferáz esetében vizsgálták a katalizált reakció gátolhatóságát ismert DNS polimeráz inhibitorokkal. Kiderült, hogy szemben a többi DNS polimerázzal a terminális transzferáz reakciót gátolja az ATP (Modak 1978), dATP (Modak 1979) és szelektíven gátolja

a diadenozin tetrafoszfát (Ap4A) (Ono K. 1980). Az utóbbi vegyület az aminosav aktiválás ellentétes irányú reakciója során keletkezik a sejtekben, in vivo koncentrációja a sejtciklussal változik, G_1 fázisú sejtek Ap4A hatására osztódni kezdtek. Az említett gátlásokat in vitro mért reakcióban figyelték meg, hogy a sejtben milyen lehetséges regulációs funkciójuk van, arra csak feltételezésekkel rendelkezünk.

Felmerül a kérdés, hogy a timusz és a csontvelő TdT aktivitása hogyan változik a korrallal, a timusz funkció csökkentésével és az egész immunrendszer involúciójával. Az indirekt immunfluoreszcencia módszerrel Bollum (1979) kimutatta, hogy patkányban a születés előtti néhány napban a TdT^+ sejtek száma ugrásszerűen megemelkedik a timuszban és a csontvelőben. A maximumot a születés utáni 2. héten éri el, majd 7–8 héten keresztül állandó marad. A timuszban és a csontvelőben megjelenő TdT^+ sejteket „stabil” sejtpopulációnak nevezi a szerző. A születés utáni első és második hét között egy ún. „tranzient” TdT^+ sejtpopuláció jelenik meg a vérben, a májban, ahonnan a 2–3. hét végére ezek a sejtek el is tűnnek. A lépben is kimutattak 1–2% TdT^+ sejtet, ezeknek az eltűnése lassúbb (Bollum 1979).

A TdT^+ pozitív sejtek kimutatásának módszerét érzékenyebbé tették Pahwa és mtsai (1981) és az új módszerrel vizsgálták a TdT^+ sejtek változását a korrallal, egér, az emberi timuszokban és csontvelőben. Azt találták, hogy a TdT enzim mennyisége változik a TdT^+ sejtekben. A sejtpopuláció 5–10%-ában van magas TdT aktivitás, ezek limfoblasztok, míg a többi TdT^+ sejtben az aktivitás alacsony (ilyen a sejtek 60–75%-a timus kortexben). A csontvelő TdT^+ sejtjei nem képeztek E-rosettát, nem aktiválhatók mitogénekkal, minden tulajdonságukban immun-inkompetens sejteknek mutatkoztak. A TdT^+ sejtek száma és a TdT enzim összaktivitása a korrallal csökken a timuszban is a csontvelőben is. Érdekes megállapítása a szerzőnek, hogy a TdT aktivitással párhuzamosan nem változik a vizsgált szervezetekben a sejtek specifikus fajsúlya, azaz a nagyság és sűrűség profilja a sejtpopulációnak (Pahwa et al. 1981). Ez arra enged következtetni, hogy nem egy speciális sejtpopuláció (TdT^+ sejtek) tűnik el a szövetből, hanem a sejt szűnik meg tovább TdT-t termelni. Ez újra arra hívja fel a figyelmet, hogy a TdT csak akkor van jelen a pre-T, ill. pre-B limfocitákban, amíg arra szükség van a sejtnek a differenciálódás alatt.

Összefoglalás

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy jelenlegi tudásunk szerint minden emlős sejt legalább három DNS polimerázzal rendelkezik, amelyek közül az α polimeráz a genom DNS replikációért, a β polimeráz a repairért és az α polimeráz által megkezdett DNS fragmentek elongációjáért felelős. A mitochondrium DNS és vele hasonló mechanizmussal duplázódó vírus DNS-ek

replikációjáért a γ DNS polimeráz felelős. Eddig csak néhány szövetben mutatták ki a δ DNS polimerázt, amely nukleáz aktivitással is rendelkezik és feltehetően a DNS pontos másolásában van szerepe. Különleges helyet foglal el a DNS polimerázok között a Terminális nukleotid transzferáz, amely csak limfoid sejtekben fordul elő és feltehetően a limfocita differenciálódásában játszik szerepet.

DNS vírussal fertőzött emlős sejtekben újabb DNS polimerázok is megjelenhetnek nagyobb DNS vírusok esetében, vagy a gazdasejt enzimei replikálják a vírus DNS-t.

IRODALOM

- Adams J. M.*: Immunology Today, **1**, (1980).
Bánfalvi G., Csuzi S. és Antoni F.: MTA Biol. Oszt. Közl. **24**, 129 (1981).
Baltimore, D.: Nature (London) **286**, 657 (1974).
Bjursell G., Gussander E. és Lindahl T.: Nature (London) **280**, 420 (1979).
Bolden A., Pedrali N. G. és Weissbach A. J.: Biol. Chem. **252**, 3351 (1977).
Bollum F. J., Groeninger E. és Yoneda M.: Proc Natl. Acad. Sci. USA **51**, 853 (1964).
Bollum F. J.: Blood **54**, 1203 (1979).
Bollum F. J.: Trends in Biochem. Sci. **2**, 41 (1981).
Brown McK., Bollum F. J. és Chang L. M. S.: Proc. Natl. Acad. Sci USA **78**, 3049 (1981).
Castellot Jr. J. J., Miller M. R., Pardee A. B. és Lehtomaki R.: Biochemie **60**, 1145 (1978).
Chan, J. Y. H. és Becker F. F.: Biochem J. **193**, 985 (1981).
Chang L. M. S. J.: Biol. Chem. **252**, 1873 (1977).
McCaffery R., Smoler D. F. és Baltimore D.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **70**, 521 (1973).
Coetzee M. L., Chon R. és Ove P.: Cancer Res. **38**, 3621 (1978).
Danse J. M., Engly J. M. és Kempf J.: FEBS Letters **124**, 84 (1981).
Detera S. D., Becerra S. P., Swack A. J. és Wilson S. H.: J. Biol. Chem. **256**, 6933 (1981).
Dosch H. M., Mansour A., Cohen A., Shore A. és Gelfand E. W.: Nature (London) **285**, 494 (1980).
Fisher P. és Korn D.: Biochemistry **20**, 4560 (1981a).
Fisher P. és Korn D.: Biochemistry **20**, 4570 (1981b).
Grummt F., Walte G., Jantzen H. M., Hamprecht K., Hübscher U. és Kuenzle C. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 6081 (1979).
Jakson D. A., Symonds R. H. és Berg P.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 2904 (1972).
Kaufman W. K., Kaufman D. G. és Grishan J. W.: Biochim. Biophys. Res. Commun. **91**, 297 (1979).
Korn D., Fischer P. A. és Wang T. S. F.: In: Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. (Ed. W. E. Cohn) Vol. **26**, pp 63—65 (1981).
Lee, M. Y. W. T., Tan C-K., Downey K. M. és So A. G.: In: Progress in Nucleic Acid Res. and Mol. Biol. (Ed. W. E. Cohn) Vol. **26**, pp. 83—85 (1981).
Mildvan A. S. és Loeb L. A.: CRC Critical Reviews in Biochemistry p. **219**, (1979).
Mirzabekov A. D.: Trends in Biochem., p. 240 (1981).
Modak M. J.: Biochemistry **17**, 3116 (1978).
Modak M. J.: Biochemistry **18**, 2678 (1979).
Molgaard, H. V.: Nature (London) **286**, 657 (1980).
Pahwa R. N., Modak M. J., McMorrow T., Pahwa S., Fernandes G. és Good R. A.: Cellular Immunology **58**, 39 (1981).
DePamphilis M. L. és Wassarman P. M.: Ann. Rev. Biochem. **49**, 627 (1980).
Pedrali N. G., Dalpra L., Pedrini M. A., Ciarrochi G., Giulotto E., Nuzzo F. és Falaschi A.: Nukleic Acids Res. **1**, 1183 (1974).
veer Reddy G. P. és Pardee A. G.: Proc. Natl. Sci. USA **77**, 3312 (1980).
Robertson D. L., Kasamatsu H. és Vinograd J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **69**, 737 (1972).
Rogers J. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 3211 (1979).
Ono K., Iwata Y., Nakamura H. és Matsukage H.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **95**, 34 (1980).
Spadari S. és Weissbach A. J.: Mol. Biol. **86**, 11 (1974).
Spadari S. és Weissbach A.: Proc. Natl. Acad. Sci USA. **72**, 503 (1975).

- Staub M., Antoni F. és Sellyei M.*: Biochem. Medicine **15**, 246 (1976).
Staub M., Spasokotskaja T., Bencsáth M., Lapis K. és Antoni F.: Chem.-Biol. Interact. **41**, 181–192 (1982).
Tyrsted G. és Munch-Peterson B.: Nucleic Acids. Res. **4**, 2713 (1977).
Van der Vliet P. C. és M. M.: Kwant. Biochemistry **20**, 2628 (1981).
Weissbach A., Baltimore D., Bollum E. és Gallo R.: Science **190**, 401 (1975).
Weissbach A.: Arch. of Biochem. and Biophys. **198**, 100 (1979).
Wicker R., Scovassi A. I. és Nocentini S.: Nucleic Acids Res. **6**, 1591 (1979).
Winnacker E. L.: Cell. **14**, 761 (1978).
Yamaguchi M., Matsukage A. és Takahashi T.: Nature (London) **285**, 45 (1980).
Yoshida S., Masaki S., Nakamura H. és Morita T.: Biochim. Biophys. Acta **652**, 324 (1981).
Weissbach A.: Annu. Rev. Biochem. **46**, 25 (1977).
Yamaguchi M., Tanabe T., Taguchi Y. N., Nishizawa M., Takahashi T. és Matsukage A.: J. Biol. Chem. **255**, 9942 (1980).