

A BAKTERIÁLIS REKOMBINÁCIÓ ENZIMEI

BÁNFALVI GÁSPÁR, CSUZI SÁNDOR és ANTONI FERENC

Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. sz. Kémiai-Biokémiai Intézet, Budapest

Bevezetés

Az utóbbi években a géneket a nukleinsav molekulák szakaszaival azonosították, felderítették a biológiai jelrendszert, a genetikai kódot és a dekódolás mechanizmusát. A genetikai információ áramlás hosszú evolúciós fejlődés eredményeként érte el jelenlegi szintjét. Nagyon valószínű, hogy a genetikai rendszer legősibb struktúrája a fehérje, és az RNS-ek is korábban jöttek létre és vettek részt a genetikai üzenet „közlekedtetésében”, mint a DNS.

A DNS a jelenleg ismert egyetlen makromolekula, mely a sejt élete folyamán nem változik, tehát *állandó* információt reprezentál. A sejt DNS tartalma egyben a sejt legjellemzőbb állandója. A sejt élete során változó sebességgel és mennyiségben szintetizálódó és lebomló RNS *mozgó* információt képvisel.

Annak ellenére, hogy a természetes génkicserélődés molekuláris mechanizmusa nem kellőképpen ismert, a kutatás jelenlegi stádiumában az ember olyan ismeretek és technikai lehetőségek birtokába jutott, melyek segítségével a genetikai információ megváltoztatására képes.

Az általános rekombinációt molekuláris aspektusból megközelítve jelen munkában a természetes génkicserélődésben résztvevő enzimeket ismertetjük és a rekombináció egyik specifikus lépését tisztázzuk a baktériumok rekombinációs enzimének, az ATP-függő DNáznak ATPázra és DNázra történt elkülönítése alapján.

Genetikai információ átvitele

A DNS minden sejt alapvető genetikai anyaga, mely nukleotid tripletekben kódolva a sejt programjának hordozója. Az információ átadása szakaszosan megy végbe, amelyet az alábbi vázlat szerint ad meg a genetika központi dogmája (18):

DNS → RNS → Fehérje

Az információ megőrzés és átvitel fő folyamatai a másolás (replikáció), az információ átírása hírvivő RNS formájába (transzkripció), és végül a hírvivő

RNS által szállított információ leolvasása, a genetikai „üzenet” dekódolása a riboszómán a fehérje bioszintézis során (transzláció).

Az RNS vírusok léte nyilvánvalóvá tette az RNS \rightarrow DNS átmenetet. A DNS-től DNS-re történő információ átvitel körfolyamatának, valamint az RNS \rightarrow DNS irányú fordított átírás (reverz transzkripció) figyelembevételével (4,69) a fenti séma az alábbiak szerint módosul:



A Gamow által feltételezett DNS \rightarrow Fehérje átmenet (28) még kísérletes bizonyításra szorul. Nincsenek adatok a genetikai információ egyéb irányú (Fehérje \rightarrow DNS, Fehérje \rightarrow RNS, Fehérje \leftrightarrow Fehérje) áramlásáról.

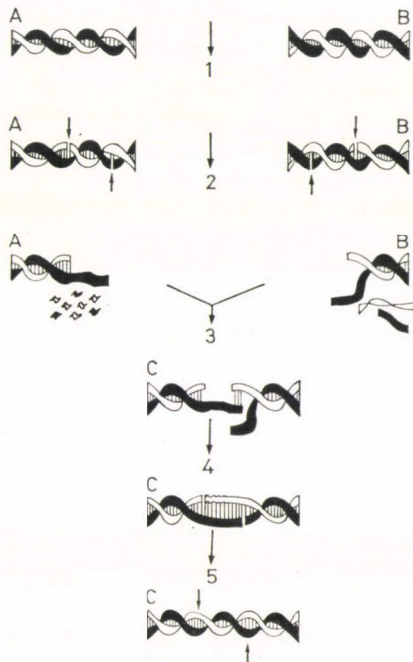
A DNS \rightleftharpoons DNS információ átadás *egyik módja* a már említett *replikáció*. A folyamat során mindkét DNS molekuláról másolat készül. Az ilyen típusú információ átvitel a genetikai anyag generációkon történő fenntartását jelenti, és felelős az adott faj tulajdonságaiért.

A DNS \rightleftharpoons DNS információ átvitel *másik módja* a rekombináció, lehetőséget nyújt a genetikai anyag további gazdagítására. A szülői gének kicserélődésének eredményeként új tulajdonságú hibrid jön létre. A rekombinációnak ezt a módját *szexuális konjugációnak* nevezzük. Prokaryotákra elsősorban nem a szexuális konjugáció, hanem az ivartalan osztódás információ átviteli forma jellemző. Baktériumokon figyelték meg a rekombináció más típusát, a *transzdukciót*; baktérium DNS darabok fág fertőzéssel bejuthatnak másik sejtbe és rekombinálódnak a sejt DNS-ével. A rekombináció legszemléletesebb megnyilvánulása a bakteriális *transzformáció*, melynek során a külső közegből származó DNS bejut a baktériumba és beépül a gazdasejt DNS-ébe. A *rekombinációs repair* egyfajta DNS „hiba javító” mechanizmus a gének kombinálódásának újabb példája. Az ibolyán túli sugárzást követő túlélés és a genetikai rekombináció közötti kapcsolatot bakteriofág rendszerben észlelték először (49). E hiba javító folyamat során ép gének vagy génszakaszok kerülnek az egyik DNS láncról a másikra.

A genetikai információ átvitel és bővítés problémáival kapcsolatos ismereteink zöme, mikroorganizmusokon végzett vizsgálatokon alapulnak. Ezek a folyamatok magasabb rendű növényi és állati sejtekben a prokaryotákhoz hasonlóan, de lényegesen bonyolultabb formában mennek végbe. A rekombinációs kísérletek kapcsán a DNS replikáció és repair kutatásoknak egyaránt nagy lendületet adott genetikailag hiányos törzsek izolálása és alkalmazása. Az eukaryota rekombinációs kísérletek jelentős hátránya, hogy ilyen mutások nem állnak rendelkezésre.

Noha a genetika alapvető jelensége maga a rekombináció, az intenzív kutatások ellenére a gének kicserélődésének molekuláris alapjairól keveset tudunk, a kromoszómák szerveződésének komplex problémája ma még megol-

datlan kérdés. A rekombináció általános élettani megnyilvánulásai eltérő molekuláris mechanizmust takarhatnak. Ezt tükrözi CLARK (16) megfogalmazása is: „A rekombináció olyan folyamatok csoportja, amelyek során DNS szakaszok hatnak egymásra, ennek eredményeként vagy a bázis sorrend, vagy gének, génszakaszok kapcsolata változik meg.” Az új definíció elveti a rekombináció egységes mechanizmusáról vallott felfogást, nem zárja ki a rekombináció elágazó, kör-körös, váltakozó mechanizmusának lehetőségét sem. A lehetőségeknek megfelelően a rekombinációs modellek száma meglehetősen nagy. Ezek ismertetése nem célunk, csupán hivatkozunk a legismertebb hipotetikus modelleket bemutató és azokat összefoglaló munkákra (30, 33, 52, 65, 66). Egyszerű általánosítás molekuláris szinten mégis elvégezhető. A homológ DNS szakaszok kicserélődésének molekuláris mechanizmusát a „törés-újra egyesítés” és a DNS fonalak szelektív másolásáról szóló „szétválasztás” elméletek magyarázzák. Az első elmélet szerint a DNS szakaszok kicserélődése független a kromoszómák megkettőződésétől, a második elmélet szerint az a DNS szintézissel kapcsolatos. Lambda fággal végzett kísérletek bizonyítékot szolgáltatottak arra vonatkozóan, hogy a rekombináció kromoszómák törése és újra egyesülése útján történik. Az általános rekombináció DRAKE (24) szerinti hipotetikus sémája egy „törés újra-egyesítése” mechanizmust mutat be (1. ábra).



1. ábra. Az általános rekombináció DRAKE (24) szerint. 1. egyszálú törések keletkezése A és B duplexen, 2. egyszálú szakaszok keletkezése letekeredéssel vagy nukleázos emésztéssel, 3. összekapcsolódás, 4. repair, 5. lánczárás

Az ábra szerint a rekombináció kezdetekor egy- vagy kétszálú törések jönnek létre a szülői duplexeken, majd egyszálú szakaszok képződnek a törések mentén. Ez utóbbiak képződésének feltétele a WATSON—CRICK-féle dupla spirál (74) széttekerése vagy nukleázos emésztése. Ezt követően az egyszálú régiók komplementer szakaszai összekapcsolódnak, majd pótlólagos nukleotid eltávolítás vagy betoldás után ép, duplaszálú rekombináns DNS molekula jön létre. Elméleti megfontolások alapján valószínű, hogy egyszálú DNS szakaszok cseréje jóval lassúbb folyamat, és hosszú homológ szakaszokat tételez fel, szemben a hasonló méretű duplaszálú DNS cseréjével. Ez utóbbi folyamat azért lehet gyorsabb, mivel a kicserélt régiókban csupán az egyszálú végek homológiája szükséges. *E. coli*-ban a rec F és rec BC reakcióutak közül a rec F közvetíti a hosszú, egyszálú szakaszok cseréjét, míg a rec BC reakcióút főleg duplaszálú, és igen rövid egyszálú DNS darabok kicseréléséért felelős (51). Az életképes rekombinánsoknak mintegy 99%-a rec BC, 1%-a rec F reakcióút során képződik. A rec BC reakcióút kulczenzime a rec B és rec C gén terméke, az exonukleáz V. Az *E. coli* rec géneire és nukleázaira a későbbiek során visszatérünk.

A rekombinációban résztvevő enzimek

1. Dezoxiribonukleázok
2. DNS polimerázok
3. DNS ligázok
4. DNS konformációt befolyásoló fehérjék

A felsorolásból feltételezhető, hogy a rekombináció több lépéses folyamatában multienzim komplex lehet a leghatékonyabb. A folyamat egyes részletei már viszonylag ismertek, más analóg folyamatok, nevezetesen a replikáció és repair révén, e folyamatokban közös enzimeik (DNáz, polimeráz, ligáz) alapján, míg más, a DNS konformáció változásával kapcsolatos részletekre az utóbbi évek kutatásai derítettek fényt. A rekombinációs folyamat specifikus enzimeit a nukleázok és a DNS konformációt befolyásoló fehérjék, ezeket részletesebben az *E. coli* példáján mutatjuk be.

I. Dezoxiribonukleázok

A nukleázoknak jelentős biológiai szerepet tulajdonítanak a DNS repair-ben, rekombinációban és az idegen eredetű DNS lebontásában (restrikció). A nukleázoknak két nagy csoportját különböztetik meg, endo- és exonukleázokat.

Az *endodezoxiribonukleázok* a DNS-re specifikus bázis szekvenciát ismerik fel, és ezek mentén hasítják a foszfodiészter kötést. A bázis szekvencia felismeré-

se a legspecifikusabb a restriktív enzimeknél. Tágabb értelemben az összes szekvenciára specifikus DNÁzt restriktív endonukleázoknak neveznek, függetlenül attól, hogy részt vesznek a baktériumba bejutó idegen eredetű DNS lebontásában vagy sem. Ezek az enzimek általában a duplex hat nukleotidját ismerik fel, szemben a kevésbé specifikus endonukleázokkal, melyek szekvencia felismerő képessége mindössze 3–4 nukleotidra terjed ki (39). A DNS endonukleolitikus hasítása valószínűleg a DNS repairben, rekombinációban, restriktívban egyaránt e folyamatok kezdetét jelenti.

Az *exodezoxiribonukleázok* képviselik a DNázok másik csoportját. Jellemző tulajdonságuk, hogy csak olyan DNS hidrolízisét katalizálják, amely a nukleáz számára hozzáférhető végálló nukleotidokat tartalmaz, ahonnan a DNS folyamatos emésztését elkezdik (39). Ez a különbség az endo- és exonukleázok között lehetőséget nyújt megkülönböztetésükre: kör-körös egy- vagy kétszálú DNS-t csak endodezoxiribonukleáz hasít. Az *E. coli* dezoxiribonukleázokat az 1. táblázatban foglaljuk össze. Az exonukleázok rendszerint a 3' hidroxí végen támadják a DNS-t (kivétel az exonukleáz V és exonukleáz VII) és mononukleotidokat hasítanak le, vagy az 5' foszfát végről szabadítanak fel di- vagy oligonukleotidokat.

A nukleázok közös jellegzetessége, hogy specifikusan vagy egyszálú, vagy kétszálú DNS-t bontanak, bár ez a megkülönböztetés nem minden endonukleáz

1. táblázat

E. coli dezoxiribonukleázok

Nukleáz	Struktúr gén	DNS szubsztrát	Hatásmód	Savoldékony DNS	Irodalom
Exonukleáz I	xon A sbc B	egyszálú	3'–5'	5'-dNMP és 5'- terminális pNpN	44, 46
Exonukleáz II* (DNS polimeráz I)	pol A	egy- és kétszálú	3'–5'	5'-dNMP	12, 47, 62
Exonukleáz III	xth	kétszálú	3'–5'	5'-dNMP	58, 59
Exonukleáz IV	—	oligonukleotidok	—	—	35
Exonukleáz V	rec B rec C	egy- és kétszálú	3'–5' 5'–3'	oligonukleotidok	29, 76
Exonukleáz VI* (DNS polimeráz I)	pol A	kétszálú	5'–3'	5'-dNMP és oligonukleotidok	22, 37, 38, 63
Exonukleáz VII	—	egyszálú	3'–5' 5'–3'	oligonukleotidok	14
Exonukleáz VIII	rec E	kétszálú	—	oligonukleotidok	42
Endonukleáz I	—	egy- és kétszálú	—	oligonukleotidok	45
Endonukleáz II	—	egy- és kétszálú	—	oligonukleotidok	26
Rec BC endonukleáz	—	egyszálú	—	oligonukleotidok	29

* DEUTSCHER és KORNBERG (22) javaslatára az exonukleáz II és exonukleáz VI elnevezéseket nem használjuk, mivel azok a DNS polimeráz I aktivitás részét képezik.

esetében érvényes. Az exonukleázok, mint említettük, bázis szekvenciára nem specifikusak, működésük csak előzetes endonukleáz hasítás, esetleg egyéb DNS károsodásból származó egy- vagy kétszálú törés után lehetséges. Ezért az exonukleolitikus DNS bontást sok esetben másodlagosnak tekintik, bár jelenlétük az említett folyamatokban nem kétséges.

Már a genetikai rekombinációval kapcsolatos korai modellek feltételezik a DNS nukleázos bontását (33, 52). Azonban nincsenek adataink arról, hogy a rekombinációs folyamat beindításában konkrétan milyen endonukleázok vesznek részt, nem tudjuk azt sem, hogyan kerülnek kapcsolatba ezzel a folyamattal. Az 1. táblázatban felsorolt exonukleázok közül a rec BC enzim emelhető ki. Az exonukleáz V vagy rec BC enzim rekombinációs közti termékek képzésében vesz részt (27), szerepére a DNS konformáció változását befolyásoló fehérjék ismertetésénél visszatérünk.

2. DNS polimerázok

A DNS polimerázok a komplementer DNS szálat használják templatként a replikációban, repairben és rekombinációban. Ez utóbbi folyamat során a homológ egyszálú komplementer szakaszok összekapcsolását követően a hiányzó DNS szakaszok betoldását DNS polimerázok végzik. A DNS polimeráz reakcióval kapcsolatban hivatkozunk a kérdést a DNS bioszintézis aspektusából összefoglaló munkákra (39, 41, 60).

3. DNS ligázok

Két DNS véget a DNS ligáz képes összekapcsolni, 3' hidroxil és 5' foszfát csoportjaik foszfodiészter kötésének képzését katalizálva (48). A kötés létrejöttéhez szükséges energiát *E. coli* esetében NAD^+ , T4 fág által indukált ligáz esetében ATP hidrolízise szolgáltatja. DNS ligáz nélkülözhetetlen a duplaszálú DNS egyszálú töréseinek javításában, egyenes alakú duplex „ragadós” végeinek („sticky” end) bázis párosodását követő kör-körös duplaszálú DNS létrehozásában, polimerázzal együttműködve DNS bioszintézisben, DNS szakaszok összekapcsolásában a genetikai rekombinációban.

4. DNS konformációt befolyásoló fehérjék

a) Fehérjék, melyek közvetlenül a DNS kiolvadását (melting) okozzák, mint az RNS polimeráz, vagy melyek specifikusan kötődnek egyszálú DNS szakaszokhoz (helix destabilizáló proteinek, rövidítésük: HDP).

b) Enzimek, melyek átmeneti egyszálú törést követően megbontják a zárt, kör-körös szupertekercs szerkezetet (relaxáló enzim = swivelase).

c) Olyan enzimek, melyek a relaxált, zárt, kör-körös DNS duplexből negatív szuperhelikális csavarodással szupertekercset hoznak létre (tekereselő enzim = gyrase).

d) Az ATP hidrolízisét és a duplaszálú DNS közvetlen széttekeredését (letekerő enzim = unwinding enzim), illetve a komplementer egyszálú szakaszok összekapcsolását (összekapcsoló enzim = windase) katalizáló enzimek.

A DNS konformációt befolyásoló fehérjék közül a HDP nem segíti elő a természetes, natív szálak elválasztását, így valószínűleg nem ez az enzim szerepe a sejtben. Valószínűbbnek látszik a denaturált struktúra rögzítésében kifejtett hatása. Szintetikus szubsztráton rövid AT gazdag szakaszokhoz kötődve viszont fellazítja a duplaszálú struktúrát (19). A relaxáló enzim a szupertekercs megbontásával csupán előkészíti a kettős spirál széttekerését. A tekereselő enzim negatív szuperhelikális szerkezetet hoz létre a relaxált, zárt, kör-körös DNS-en. Jelenleg intenzív kutatások tárgyát képezi az, hogy milyen módon fejti ki ezt a hatást, és milyen kapcsolatban van ez a rekombinációval és replikációval. Jelenlegi feltevés szerint a tekereselő enzim hozná létre a replikáció, illetve a rekombináció során a hélix forgásával fellazított szerkezetből a negatív szupertekercset. A tekereselésnek a rekombinációban játszott szerepe vitatott kérdés. SMITH és mtsai (68) szerint gyrase csak a transzkripcióhoz szükséges. MIZUCHI és mtsai (53) feltételezik a rekombináció negatív szuperhelikális DNS szükségletét, és a tekereselő enzim szerepét a duplex szálainak elkülönítésében. BEATIE és mtsai úgy vélik, negatív szupertekercsek megkönnyítik egyszálú DNS darabok felvételét (9).

A duplex felgombolyítása energiaigényes folyamat, az ezzel kapcsolatos DNS konformáció változást eredményező reakciók függenek a sejt ATP tartalmától. Ha a sejt nem rendelkezik megfelelő energiakészlettel, a DNS szupertekercsek gyorsan eltűnnek, s a DNS konformáció változásával összefüggő reakciók nem játszódhatnak le. Ez a szabályozó mechanizmus önmagától értetődő prokaryota sejtekben. Eukaryota sejtekben a tekereselő enzimet nem találták meg, és jelenlétét nem is feltételezik. Valószínűleg az eukaryota „bemetsző-záró” („nicking-closing”) enzim elegendő a replikáció során keletkezett pozitív szupertekercsek eltávolításához. A prokaryota szupertekercsek helyett eukaryotákban nukleoszómákat találunk. Feltételezik, hogy egy-egy DNS tekeredés a nukleoszóma körül megfelel egy-egy szuperhelikális huroknak (21). Abból a tényből kiindulva, hogy az eukaryota DNS nem tartalmaz szupertekercset, adódik a feltevés, hogy az eukaryota duplex nincs széttekeredésre kényszerítve, ezért replikációban és rekombinációban letekerő enzimek részvétele kétséges.

A prokaryota rekombináns DNS molekula képződésének feltétele egyszálú DNS szakaszok keletkezése, letekeréssel vagy nukleázos emésztéssel (1. ábra). Ilyen vonatkozásban a felsorolt enzimek közül a letekerő enzimeknek

kitüntetett szerepük van. A letekerő enzimek a DNS szálak széttekeréséhez szükséges energiát ATP, dATP, esetleg egyéb nukleotid trifoszfát hidrolízisével nyerik. Az *E. coli* letekerő fehérjék közül (13) a DNS unwinding enzim, a rep protein és a rec BC nukleáz valószínűleg részt vesz a rekombinációban.

Az *E. coli* DNS-t letekerő enzimek vagy *helikázok* (2) egyszálú DNS-re specifikus ATPázok, melyek az egyszálú szakaszokhoz kötődnek, innen kezdik letekerni a duplaszálú DNS-t (3). A DNS replikációt és rekombinációt kódoló gének mutációja nem befolyásolja a helikázok aktivitását (1), bár kézenfekvő lenne szerepük ezekben a folyamatokban. In vivo szerepük egyelőre nem tisztázott.

A *rep protein* egyike azon *E. coli* fehérjéknek, amely bizonyos fágok (pl. ϕ X 174) replikációjához szükséges (20). Rep protein hiányos sejtekben a gazdasejt DNS-ének replikációja is lassúbb (43). A rep protein tisztítása során derült ki, hogy az valójában egy egyszálú DNS-re specifikus ATPáz (61), mely a ϕ X 174 DNS replikatív formájának (kör-körös duplex) széttekerésében vesz részt. Az enzim preferenciálisan kapcsolódik a ϕ X 174 DNS replikációs villához. Katalitikus aktivitásához az ATP energiájára, ϕ X 174 cisztron A fehérjére (nukleáz), DNS polimeráz III holoenzimre, HDP-re, Mg^{2+} ionokra és a négy dezoxiribonukleozid trifoszfátra van szüksége (43).

Rec BC nukleáz

Minden mutáció, mely az *E. coli* rec génjeit (A, B, C, D, E, F, G, H, J, K) éri, csökkent rekombinációs készséget eredményez, ugyanakkor a plazmid átörökítést (rezisztencia-, sex faktor) nem befolyásolja. A rec mutánsok a csökkent rekombinációs gyakoriság mellett, számos pleiotróp tulajdonsággal rendelkeznek: érzékenyek ibolyán túli besugárzással, röntgen- vagy gammasugárzással szemben (49), profágjuk nem indukálható (11, 31), érzékenyek mutagénekkel szemben (34, 72), temperált fággal nem tehetők lizogénné (32, 67). Ezek a tulajdonságok alkalmasak a rec⁻ mutánsok megkülönböztetésére és magyarázattal szolgálnak a rec gének számát illetően. A rec mutációkon kívül ismeretesek olyan genetikai károsodások, melyek a rekombinációval csak közvetett módon állnak kapcsolatban. Számos ibolyán túli fényre érzékeny mutánsnak besugárzás után sem csökken jelentős mértékben a rekombinációs készsége. *E. coli* esetében legalább hat ilyen uvr gént írtak le (17). Ismeretesek más, vegyületekre érzékeny mutációk is (rac, sbc, lex stb.), melyek nukleáz aktivitása változatlan, a rekombináció gyakoriságát áttételesen befolyásolják, feltehetően azért, mert nem a rekombináció „fő útján” fekszenek.

Az *E. coli* rec mutációk közül a rec A, B és C génekről tudunk a legtöbbet. A rec A gén mutációja a rekombináció gyakoriságának csökkenésén kívül, az exonukleáz V aktivitás kiesését is eredményezi. A rec A, B és C mutánsok tulajdonságait a 2. táblázat tünteti fel. A rec A gén mutációjának eredménye a re-

2. táblázat

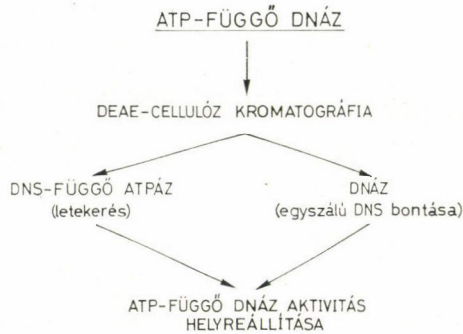
E. coli rec⁻ mutánsok sajátosságai

Mutáns	Rec A ⁻ („reckless”)	Rec B ⁻ („cautious”)	Rec C ⁻ („cautious”)
Rekombináció gyakorisága	drasztikusan csökkent	csökkent	csökkent
Érzékenység ultraibolya sugárzás, röntgen, mitomycin és alkyláló vegyületek iránt	magas	fokozott	fokozott
DNS bontás ultraibolya besugárzás után	fokozott	csökkent	csökkent
Egyszálú törések repairje	nem képes javítani	képes javítani	képes javítani
λ fág spontán produkciója	alacsony	normális	normális
Exonukleáz V aktivitás	fokozott	csökkent	csökkent

kombináció drasztikus csökkenése, magas sugárérzékenység és a sugárkárosodott DNS gyors bontása. E tulajdonságok miatt a rec mutációt gátlástalannak („reckless”) is nevezik, szemben a rec B és rec C óvatos („cautious”) mutációval. A rec A génről feltételezik, hogy olyan fehérjét határoz meg, mely a DNS bontását, így az exonukleáz V aktivitását is szabályozza. Újabban kimutatták, hogy a rec A protein katalizálja komplementer egyszálú DNS szakaszok összekapcsolását egy olyan reakcióban, mely az ATP hidrolíziséhez kötött (75). A rec A gén termék hatása feltehetően ellentétes a letekerő enzimek hatásával. A rec A protein összekacsoló hatásából adódóan duplex DNS szakaszok képződését katalizálva, jelentős szerepet játszana a rekombinációban és repairben egyaránt (10).

A rec B, rec C mutánsok csökkent rekombinációs készséget mutatnak, szintén érzékenyek ibolyán túli és röntgensugárzással szemben, és alacsony exonukleáz V aktivitással rendelkeznek (5, 56). Ebből adódott a feltevés, hogy a rec B és rec C gének az exonukleáz V struktúr génjei (5). A rekombinációban feltételezett szerepe miatt az enzimet az *E. coli* rekombinációs enzimének tekintik (76). Az *E. coli* exonukleáz V, más néven rec BC enzim egy ATP-függő DNáz, melynek számos hatása között duplaszálú és egyszálú exonukleolitikus (29, 54, 56), egyszálú endonukleolitikus (29) és DNS-függő ATPáz aktivitás (25, 29, 54, 56) egyaránt szerepel. Az ATP-függő DNáz aktivitást számos baktérium törzsben megtalálták (5, 15, 25, 29, 54, 56, 73, 76), eukaryotákban nem írták le. Az ATP-függő DNáz rekombinációval való kapcsolatát más baktériumok esetében is igazolták (15, 73).

A bakteriofágok közül a lambda rekombinációs rendszer és az exonukleáz V kapcsolatát vizsgálták behatóbban (66). A lambda fág rekombinációjához nincs szükség exonukleáz V-re. Ennek kettős magyarázata van. Az egyik az, hogy a lambda fágoknak saját rec génjei vannak, a red X és a red B. Red X egy ismert funkciójú exonukleázt határoz meg, mely *in vitro* rekombinációs rend-



2. ábra. ATP-függő DNáz inaktíválódása és aktivitásának helyreállítása. *B. cereus*ból izolált ATP-függő DNáz (6) DEAE-cellulóz kromatográfiával DNS-től függő ATPázra és egyszálú DNS-re specifikus DNázra különíthető (7). Az elválasztott enzimek újraegyesítésével az ATP-függő DNáz aktivitás helyreállítható (7)

szerben is hatékonyan működik. Red B egy ismeretlen funkciójú fehérjét kódol, melynek feltételezett szerepe azonos lenne az *E. coli* rec A gén ellenőrző funkciójával. A másik ok, amiért az exonukleáz V hatástalan fág jelenlétében, az, hogy olyan gént (gam) is hordoz (17, 67), melynek terméke semlegesíti az exonukleáz V aktivitást. Gam⁺ fággal fertőzött sejtek nem képesek rekombinálódni. Gam⁻ red⁻ fágot használva fertőzésre, a rekombináció exonukleáz V függő volt (71). Ez az eredmény is alátámasztani látszik az exonukleáz V rekombinációs szerepét.

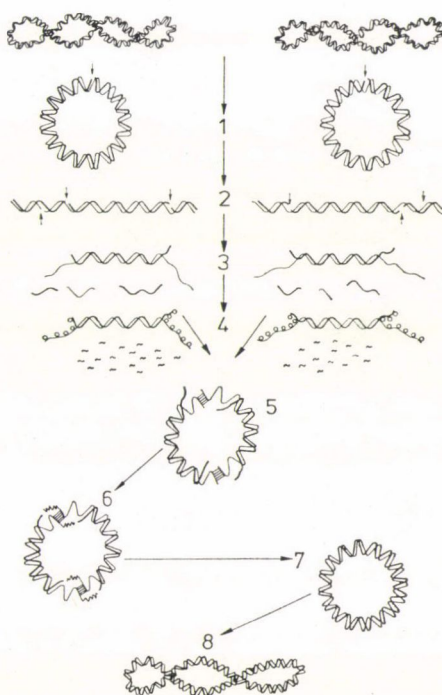
*Bacillus cereus*ból izolált és részlegesen tisztított ATP-függő DNázzal (6) igazoltuk az enzim már említett és sokat vitatott multifunkcionális sajátosságait. Részlegesen tisztított enzimet DEAE-cellulóz oszlopon kromatografálva nagy kromatográfiás felbontóképesség alkalmazásával DNS-függő ATPázok és egyszálú DNS-re specifikus DNáz elkülönülését tapasztaltuk. Egyidejűleg az ATP-függő DNáz aktivitás eltűnését regisztráltuk. Az elkülönített DNS-függő ATPázok és a DNáz újraegyesítésével az ATP-függő DNáz aktivitás helyreállítható volt (7). A DNÁztól elkülönített DNS-függő ATPáz a duplészakadás katalizálta (8). Az eredmények, melyeket szemantikusan a 2. ábra foglalja össze, arra utalnak, hogy az ATP-függő DNáz aktivitást több enzim kölcsönhatása hozza létre. Feltételezzük, hogy a rekombinációban a duplex széttekerését az egyszálú szakaszokhoz kapcsolódó letékerő ATPázok végzik, majd az ily módon keletkezett egyszálú DNS darabokat az ezekre specifikus nukleázok bontják.

Az ATP-függő DNáz aktivitást ATPáz és DNáz enzimek kölcsönhatásaként értelmezve számos, az exonukleáz V aktivitással kapcsolatos probléma válik érthetővé:

1. Az elkülöníthető ATPáz és DNáz funkció, melyet mások is leírtak (36), két enzim feltételezése esetén egyértelművé válik.

2. Az ATP-től függő DNáz DEAE-cellulóz kromatográfiás tisztítása során tapasztalt inaktiválódása (6, 23, 55, 56, 64) az ATPáz és DNáz teljes elkülönítésével, illetve ezen enzimek kölcsönhatásában feltehetően szerepet játszó celluláris DNS eltávolításával magyarázható. Érthetővé válik az is, hogy az elektroforetikusan homogén DNáznak (57) miért nincs ATP-től függő nukleáz aktivitása.

3. A csak natív DNS-en mérhető ATP-függő DNáz aktivitás mellett, mindig detektálható ATP-től független DNáz aktivitás is (6, 23). Ez utóbbi aktivitást a natív DNS egyszálú szakaszainak tulajdonítjuk. Exonukleáz V aktivitás csak olyan natív DNS-en mérhető, melynek egyszálú végei vannak. Zárt, kör-körös duplexen nem mérhető ATP-függő DNáz aktivitás (29).



3. ábra. Az általános rekombinációban résztvevő enzimek. Az egyes lépésekben feltételezett enzimek: 1. szupertekercs szerkezet megbontása — relaxáló enzim, 2. egy- és kétszálú bemosztások — endonukleáz hasítás, 3. letekeredés — DNS függő ATPáz, 4. széttekeredett szakaszok védelme — HDP, 5. komplementer egyszálú végek bázis párosodása — összekapcsolódó enzim, 6. nukleotid betoldása — polimeráz, 7. lánczárás — ligáz, 8. rekombináns szupertekercs kialakulása — gyrase

4. A denaturált DNS-en mások által is észlelt nagyfokú hidrolízis (29, 54, 56) annak következménye, hogy a DNáz valójában egyszálú DNS-re specifikus enzim.

A részreakciókra bontható ATP-függő DNáz ATP igényéért, azaz a natív DNS energia igényes széttekeréséért a letekerő ATPáz tehető felelőssé. Feltételezhető szerepénél fogva nem hagyható figyelmen kívül a rekombinációs mechanizmus tárgyalásakor sem. Az általános rekombináció 1. ábrán bemutatott sémáján a rekombinációs DNS szakaszok keletkezésére vonatkozó alternatív lépéseket, a letekerést és a nukleázos emésztést egyaránt valószínűnek tartjuk. Feltételezzük, hogy az ATP igényes részleges denaturálás az elsődleges reakció, és azt követi a letekert egyszálú DNS nukleázos emésztése. A rekombinációs sémának ez a pontosítása összhangban van a DNS-től függő ATPázok (2, 40), és az ATP-től függő DNázok (50, 64) duplex széttekerő hatásáról vallott felfogásával, a DNázok rekombinációban játszott szerepével, és kiküszöböli az ATP-függő DNázok multifunkcionális hatását.

A bemutatott séma az összetett rekombinációs folyamatnak csupán egy részlete, így korántsem teljes. Nem veszi számításba a folyamatban résztvevő egyéb fehérjéket. Ezek szerepét sematikusan a 3. ábra segítségével szemléltetjük. Feltételezhető, hogy a relaxáló enzim kör-körös DNS-sé „teríti ki” a szuperhelikális DNS-t. A relaxált DNS-en egyszálú bemetszéseket hoznak létre az endonukleázok, majd a törések mentén a duplex széttekeredik a letekerő ATPázok hatására. A HDP, melyet a 3. ábrán apró körök formájában tüntetünk fel, a komplementer szálakra tapadva sztérikusan gátolja a bázis párosodást a levált szakaszokkal, illetve védi az egyszálú végálló szakaszokat a nukleáz emésztésével szemben. A letekert szálakat egyszálú DNS-re specifikus DNáz bontja, majd heteroduplex régiók jönnek létre. A komplementer régiók összekapcsolásában feltételezhető a rec A protein szerepe. A felesleges nukleotidokat a DNáz távolítja el. A hiányzó nukleotidok pótlásáról a polimeráz gondoskodik, majd ligáz hatására zárul a rekombináns molekula. A relaxált duplexet végül a gyrase gombolyítja fel szuperhelikális struktúrává.

IRODALOM

1. ABDEL-MONEM, M., HOFFMANN-BERLING, H.: Eur. J. Biochem. **65**, 431 (1976).
2. ABDEL-MONEM, M., CHANAL, M. C., HOFFMANN-BERLING, H.: Eur. J. Biochem. **79**, 33 (1977).
3. ABDEL-MONEM, M., LAUPPE, H. F., KARTENBECK, J., DÜRWARD, H., HOFFMANN-BERLING, H.: J. Mol. Biol. **110**, 667 (1977).
4. BALTIMORE, N.: Nature (London) **226**, 1209 (1970).
5. BARBOUR, S., CLARK, J. A.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA **65**, 955 (1970).
6. BÁNFALVI, G., CSUZI, S., OHLBAUM, A., ANTONI, F.: Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. **14**, 53 (1979).
7. BÁNFALVI, G., CSUZI, S., OHLBAUM, A., ANTONI, F.: Acta Biol. Acad. Sci. Hung. (Közlésre elfogadva).
8. BÁNFALVI, G., OHLBAUM, A., CSUZI, S., ANTONI, F.: Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. (Közlésre elfogadva).
9. BEATTIE, K. L., WIEGAND, R. C., RADDING, C. M.: J. Mol. Biol. **116**, 783 (1977).

10. BRIDGES, B. A.: *Nature* **277**, 514 (1979).
11. BROOKS, K., CLARK, A. J.: *Viol. I*, 283 (1967).
12. BRUTLAG, D., KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.* **247**, 241 (1972).
13. CHAMPOUX, J. J.: *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 449 (1978).
14. CHASE, J. W., RICHARDSON, C. C.: *J. Biol. Chem.* **249**, 4553 (1974).
15. CHESTUKHIN, A. V., SHEMYAKIN, M. F., KALININA, N. A., PROZOROV, A. A.: *FEBS Lett.* **24**, 121 (1972).
16. CLARK, A. J.: *Ann. Rev. Microbiol.* **25**, 437 (1971).
17. CLARK, A. J.: *Ann. Rev. Genet.* **7**, 67 (1973).
18. CRICK, F. H. C.: *Symp. Soc. Exp. Biol.* **12**, 138 (1958).
19. DELINS, H., MANTELL, N. J., ALBERTS, B. M.: *J. Mol. Biol.* **67**, 341 (1972).
20. DENHARDT, D. T., IWAYA, M., LARISON, L. L.: *Virology* **49**, 486 (1972).
21. DENHARDT, D. T.: *Nature* **280**, 196 (1979).
22. DEUTSCHER, M. P., KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.* **244**, 3029 (1969).
23. DOLY, J., ANAGNOSTOPOULOS, C.: *Eur. J. Biochem.* **71**, 309 (1976).
24. DRAKE, J. W.: *The Molecular Basis of Mutation*, Holden-Day, San Francisco, California (1970).
25. EICHLER, D. C., LEHMAN, I. R.: *J. Biol. Chem.* **252**, 499 (1977).
26. FRIEDBERG, E. C., GOLDTWAIT, D. A.: *Cold. Spring Harbour Smp. Quant. Biol.* **33**, 271 (1968).
27. FRIEDMAN, E. A., SMITH, H. O.: *Nature New Biol.* **241**, 54 (1973).
28. GAMOW, G.: *Nature* **173**, 318 (1954).
29. GOLDMARK, P. J., LINN, S.: *J. Biol. Chem.* **247**, 1849 (1972).
30. HATSKISS, R. D.: *Ann. Rev. Microbiol.* **28**, 445 (1974).
31. HERTMAN, J., LURIA, S. E.: *J. Mol. Biol.* **23**, 117 (1967).
32. HOLLOWAY, B. W.: *Bacteriol. Rev.* **33**, 419 (1969).
33. HOLLIDAY, R.: *Genet. Res.* **5**, 282 (1964).
34. HOWARD-FLANDERS, P., THEIROT, L.: *Genetics* **53**, 1137 (1966).
35. JENSEN, S. E., KOERNER, J. F.: *J. Biol. Chem.* **241**, 3090 (1966).
36. KARU, A. E., MACKAY, V., GOLDMARK, P. J., LINN, S.: *J. Biol. Chem.* **248**, 4874 (1973).
37. KELLY, R. B., ATKINSON, M. R., HUBERMAN, J. A., KORNBERG, A.: *Nature* **224**, 495 (1969).
38. KLETT, R., CERAMI, A., REICH, E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **60**, 943 (1968).
39. KORNBERG, A.: *DNA Synthesis*, W. H. Freeman and Company, San Francisco, California (1974).
40. KORNBERG, A., SCOTT, J. F., BERTSCH, L. L.: *J. Biol. Chem.* **253**, 3298 (1978).
41. KORNBERG, T., KORNBERG, A.: *The enzymes*, Vol. X. (ed. Boyer), Acad Press (1974).
42. KUSHNER, S. R., NOGAISHI, H., CLARK, A. J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 3593 (1974).
43. LANE, H. E. D., DENHARDT, D. T.: *J. Mol. Biol.* **97**, 89 (1975).
44. LEHMAN, I. R.: *J. Biol. Chem.* **235**, 1479 (1960).
45. LEHMAN, I. R., ROUSSOS, G. G., PRATT, E. A.: *J. Biol. Chem.* **237**, 819 (1962).
46. LEHMAN, I. R., NUSSBAUM, A. L.: *J. Biol. Chem.* **239**, 2628 (1964).
47. LEHMAN, I. R., RICHARDSON, C. C.: *J. Biol. Chem.* **239**, 233 (1964).
48. LEHMAN, I. R.: *The enzymes*, Vol. X. (ed. Boyer), Acad. Press (1974).
49. LURIA, S. E.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **33**, 256 (1947).
50. MACKAY, V., LINN, S.: *J. Biol. Chem.* **251**, 3716 (1976).
51. MAHAJAN, S. K., DATTA, A. R.: *Mol. Gen. Genet.* **169**, 67 (1979).
52. MESELSON, M. S., RADDING, C. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 358 (1975).
53. MIZUCHI, K., GELLERT, M., NASH, H. A.: *J. Mol. Biol.* **121**, 375 (1978).
54. NOBREGA, F. G., ROLA, F. H., PASETTO-NOBREGA, M., OISHI, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 15 (1972).
55. OHI, S., SUEORA, N.: *J. Biol. Chem.* **248**, 7336 (1973).
56. OISHI, M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **64**, 1292 (1969).
57. PALITTI, F., VELLANTE, F., CERIO-VENTURA, G., FASELLA, P., SALERNO, C.: *Eur. J. Biochem.* **97**, 147 (1979).
58. RICHARDSON, C. C., KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.* **239**, 242 (1964).
59. RICHARDSON, C. C., LEHMAN, I. R., KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.* **239**, 251 (1964).
60. SÁGI J.: *A biológia aktuális problémái* **15**, 11 (1979).
61. SCOTT, J. F., EISENBERG, S., BERTSCH, L. L., KORNBERG, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**, 193 (1977).
62. SETLOW, P., BRUTLAG, D., KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.* **247**, 224 (1972).
63. SETLOW, P., KORNBERG, A.: *J. Biol. Chem.* **247**, 232 (1972).
64. SHEMYAKIN, M. F., GREPACHEVSKY, A. A., CHESTUKHIN, A.: *Eur. J. Biochem.* **98**, 417 (1979).

65. SIGAL, N., ALBERTS, B.: *J. Mol. Biol.* **71**, 789 (1972).
66. SIGNER, E.: *The Bacteriophage Lambda* (ed. A. D. Hershey) p. 139, Cold Spring Harbour (1971).
67. SIRONI, G.: *Virology* **37**, 163 (1969).
68. SMITH, C. L., KUBO, M., IMAMATO, F.: *Nature* **275**, 420 (1978).
69. TEMIN, H. M., MIZUTANI, S.: *Nature (London)* **226**, 1211 (1970).
70. UNGER, R. C., CLARK, A. J.: *J. Mol. Biol.* **70**, 539 (1972).
71. UNGER, R. C., ECHOLS, H., CLARK, A. J.: *J. Mol. Biol.* **70**, 531 (1972).
72. VAN de PUTTE, P., ZWENK, H., RORSCH, A.: *Mutation Res.* **3**, 381 (1966).
73. VOVIS, G., BUTTIN, G.: *Biochim. Biophys. Acta* **224**, 42 (1970).
74. WATSON, J. D., CRICK, F. H. C.: *Nature* **171**, 964 (1953).
75. WEINSTOCK, G. H., Mc. ENTEE, K., LEHMAN, I. R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**, 126 (1979).
76. WRIGHT, M., BUTTIN, G., HURWITZ, J.: *J. Biol. Chem.* **246**, 6543 (1971).