

# GÉN MŰKÖDÉS ÉS NUKLEINSAVSZERKEZET

VENETIANER PÁL

MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézete

A DNS szerkezeti modelljének megalkotása (26), a gén és az általa kódolt fehérje kolinearitásának bizonyítása (27), valamint a genetikai kód megfejtése (12, 16, 17) szilárdan megalapozták mai elképzeléseinket arról, hogy *általában* hogyan határozza meg a DNS nukleotidsorrendje az általa kódolt fehérjék szerkezetét. Azt is tudjuk, hogy a fehérjekódoló funkciót betöltő DNS-en kívül vannak a DNS-nek olyan szakaszai, amelyek szabályozó szerepet játszanak, mintegy utasításokat adnak a leolvasó rendszernek a működés megkezdésére, leállítására, a működés igények szerinti fokozására vagy csökkentésére. Mivel a DNS-szerkezet (nukleotidsorrend) vizsgálata a közelmúltig lehetetlen volt, e szabályozó funkció vizsgálatára csak indirekt, genetikai módszerek álltak rendelkezésünkre. A molekuláris genetika teljesítő-képességének gyönyörű bizonyítéka, hogy így is sikerült a génműködés szabályozásának olyan modelljét megkonstruálni (8), amely a későbbi közvetlen szerkezeti vizsgálatok fényében lényegében helytállónak bizonyult.

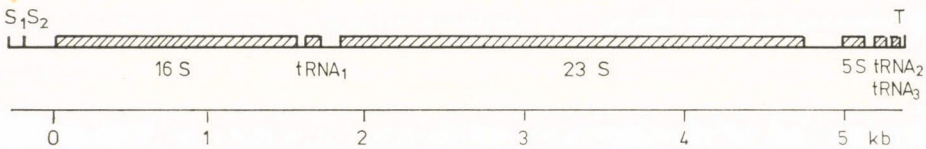
A hetvenes évek szenzációs eredményei: a DNS-t meghatározott nukleotidsorrendű helyeken bontó restriktív endonukleáz enzimek felfedezése (21), a génebézés (in vitro DNS rekombináció, DNS klónozás) technikájának kialakulása (2, 7), valamint a gyors DNS szekvencia-meghatározási módszerek kidolgozása (13, 20) lehetővé tették elvben bármely kiszemelt DNS-szakasz izolálását és teljes szerkezetének megállapítását. Így esetről esetre, teljes egyéni bonyolultságában tanulmányozható a génműködés, szabályozás és a nukleinsavszerkezet közötti összefüggés. Természetesen a feladat általános elvi megoldhatósága nem jelenti azt, hogy könnyű és gyors válaszokat kaphatunk a feltett kérdésekre. Az eddig analizált esetek száma még kevés, nem elegendő a széles körű általánosításhoz. Minden új kísérleti rendszer új, sokszor meglepő vonásokkal gazdagítja az eddig még elég hiányos képet.

A következőkben a bevezetőkben mondottakat saját kísérleti munkánk eredményeinek ismertetésével szeretném alátámasztani.

A munkacsoportunkban évek óta vizsgált kísérleti rendszer: a bakteriális riboszomális RNS-t kódoló gének, három ok miatt látszottak különösen vonzó objektumnak az ilyen típusú vizsgálat számára.

1. Ezek a bakteriális genom legaktívabban működő, legnagyobb frekvenciával átírt génei, amelyek működése többirányú bonyolult szabályozás alatt áll.
2. A szabályozás kizárólag génszinten történhet, mert az átírási termék, az RNS, nem íródik át fehérjévé, transláció nincs.
3. Mivel az rRNS-t kódoló gének redundánsak (több példányban fordulnak elő a genomban) és működésük létfontosságú, genetikai eszközökkel egyáltalán nem vizsgálhatók.

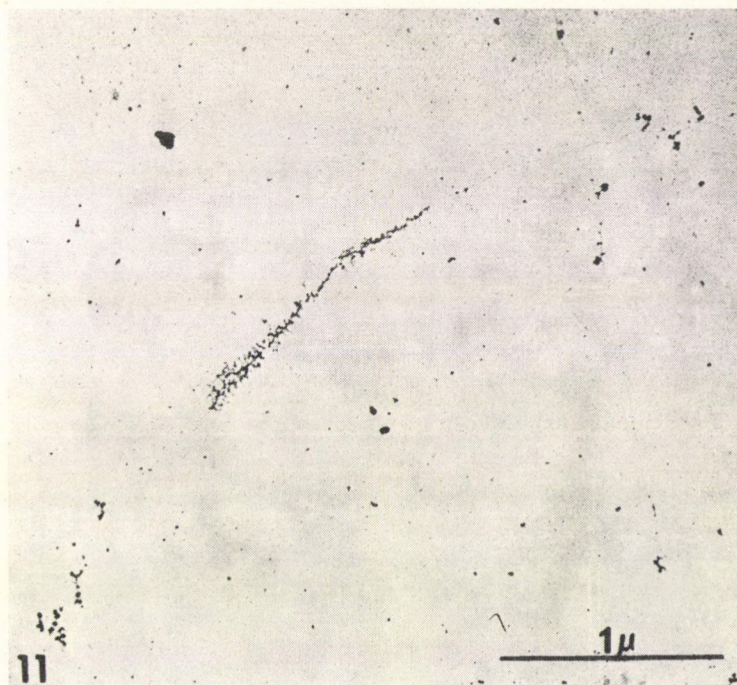
Fenti okok miatt úgy véltük, hogy e rendszer elemzése az új technikák által kínált lehetőségek teljes kihasználásával, új vonásokkal gazdagíthatja a nukleinsavszerkezet és génműködés összefüggéseiről kialakuló képet.



1. ábra. Az rRNS-t kódoló gén (operon). Satírozva az érett rRNS és tRNS molekulákat kódoló szakaszok

Munkánk indulásakor tudtuk, hogy a három különböző riboszomális RNS-t egy nagy gén (egyes szerzők szerint operon) kódolja, az átírás elsődleges terméke egy 30 S ülepedési állandójú, több mint 5 kilobázis hosszúságú RNS, amely számos közbenső lépésen keresztül, többszörös lánchasítással alakul át érett, 16S (kb. 1500 nukleotid), 23S (kb. 3000 nukleotid) és 5S (120 nukleotid) rRNS molekulákká (15). Mivel az érési reakciók már az átírás közben megkezdődnek, normális körülmények között a teljes hosszúságú prekursor nem fordul elő a sejtben. Egy rRNS gén (operon) sematikus szerkezetét mutatja az 1. ábra, a kép figyelembe veszi azt a nemrég megismert tényt, hogy a három riboszomális RNS-en kívül a prekursor tartalmaz 2–4 transzfer RNS molekulát is (14). Már említettük, hogy az ismertett szerkezetű rRNS gén redundáns, több, egymáshoz hasonló vagy azonos kópiában fordul elő a genomban. E gének egymástól izoláltan helyezkednek el, számukat 5–10 közötti értékre becsülték (22). Az átírás intenzitását elsősorban a növekedési ráta szabályozza. Exponenciálisan növekvő sejtben a genom nem egészen 1 %-át kitevő rRNS géneken folyik az összes transzkripció 50–70 %-a (18). Kiszámítható, hogy maximális növekedési sebességnél a riboszómaszintézis igényeinek fedezésére az rRNS géneknek a fizikailag egyáltalán lehetséges maximális kapacitással kell működniük. Ez annyit jelent, hogy — mint a 2. ábrán látható elektronmikroszkópos felvétel mutatja — a polimeráz molekulák sűrűn egymás után követik egymást a transzkripció közben, jóval sűrűbben mint más, fehérjéket kódoló géneken.

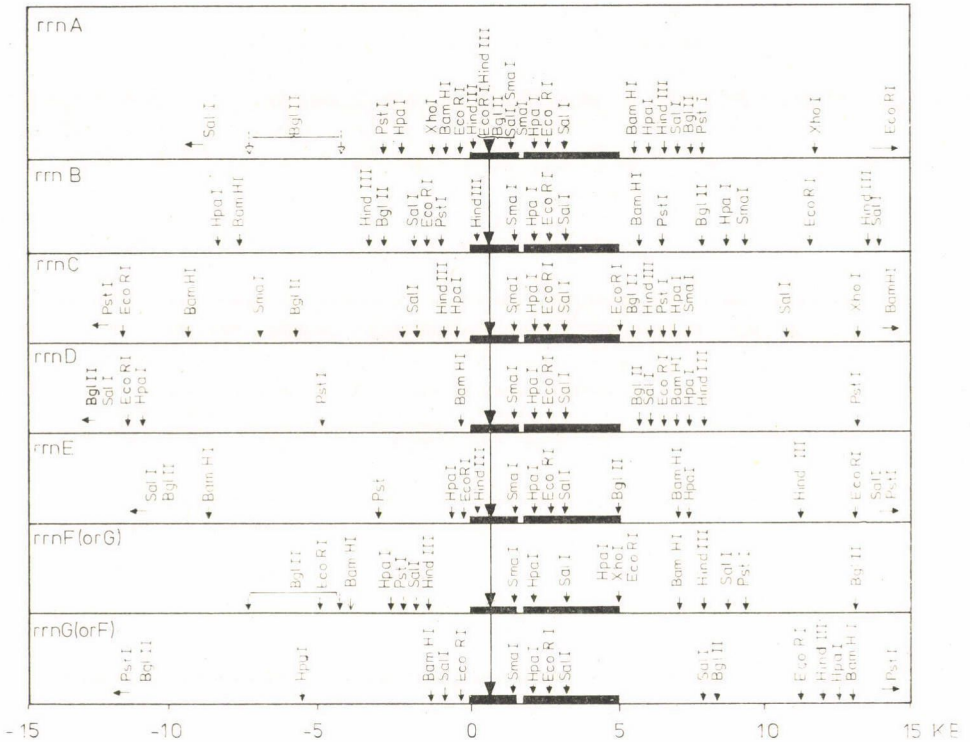
Kiinduló pontunk tehát az az alapkérdés volt: a szabályozó régió (promoter) milyen sajátosságai magyarázzák az rRNS gének extrém magas átírási intenzitását. Munkánk első fázisában, lényegében hagyományos módszerekkel vizsgáltuk teljes bakteriális DNS-en az rRNS gének transzkripcióját, illetve az RNS-polimeráz enzim kötődését e génekhez (23, 24, 25). Eredményeink magyarázatára azt a munkahipotézist állítottuk fel, hogy az rRNS gének promoter régiói összetett struktúrák, amelyek génenként 4–5 RNS-polimeráz molekulát tudnak megkötni rajtkész állapotban. Ez a raktározó kapacitás



2. ábra. A működő rRNS gén elektronmikroszkópos képe (HAMAKALO és MILLER nyomán)

biztosítja, hogy az átírás folyamatos legyen; amint egy polimeráz molekula továbbhaladt, helyét a startponton azonnal elfoglalhatja az ugrásra készen álló következő. Azt is feltételeztük, hogy a raktározott polimeráz molekulák közül egynek — valószínűleg az elsőnek — különösen erős a kötése és ez az erősen kötött polimeráz mintegy védi az egész régiót. Bár ez a modell jól egyezett összes megfigyeléseinkkel és az irodalmi adatok döntő többségével, közvetlen igazolását (vagy cáfolatát) csak az új technikák felhasználásával remélhettük. Célul tűztük ki tehát egy vagy több ilyen DNS-szakasz klónozását, teljes nukleotidsorrendjének meghatározását és a kötési helyek pontos megállapítását elektronmikroszkópos vizsgálatokkal. Ennek előfeltétele az

volt, hogy megállapítsuk az rRNS gének pontos számát, elhelyezkedését és közvetlen környezetük fizikai térképét. A restriktációs endonukleázok egy újszerű felhasználásával megállapítottuk, hogy az *Escherichia coli* genomjában hét rRNS gén van, majd e technika továbbfejlesztésével sikerült feltérképez-

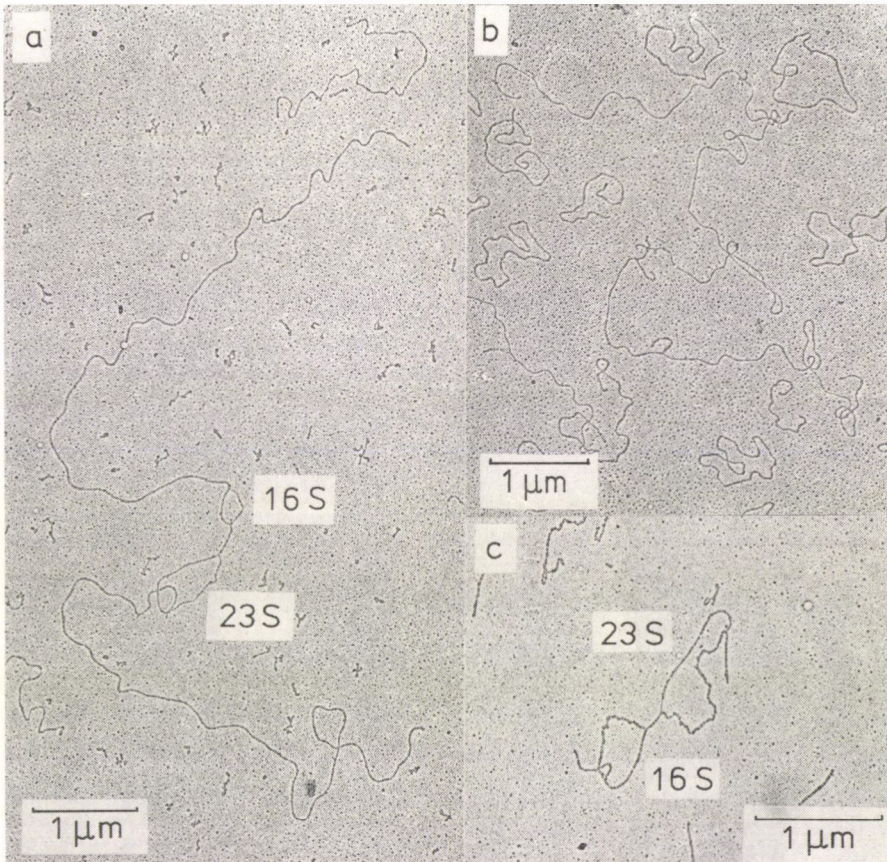


3. ábra. A hét rRNS gén és közvetlen környezetük fizikai térképe. A vastag fekete vonal az érett 16S és 23S rRNS-t kódoló szakasz. A nyilak az egyes restriktációs enzimek hasítóhelyeit jelzik, a föléljük írt szimbólumok az enzimek konvencionális rövidítései. A középső függőleges vonal egy olyan — mind a hét génben előforduló — rövid szakaszt jelez, ahol a jelzett öt enzimeknek van hasítóhelye

nünk mind a hét rRNS gént és közvetlen környezetét (1, 10). A térkép, amely a 3. ábrán látható, biztos tájékoztató pontot kínált a részletesebb szerkezeti és funkcionális vizsgálat számára.

Mint ismeretes, a DNS-klónozási technika (génebesztet) segítségével egy adott DNS-szakasz áthelyezhető egy másik replikálódó DNS-molekulába (vektorba), amely megfelelő gazdasejtben nagy mennyiségben szaporítható. Ily módon a vizsgálandó DNS-szakasz tisztán előállítható milligrammos nagyságrendű mennyiségben. E módszer felhasználásával sikerült az egyik rRNS

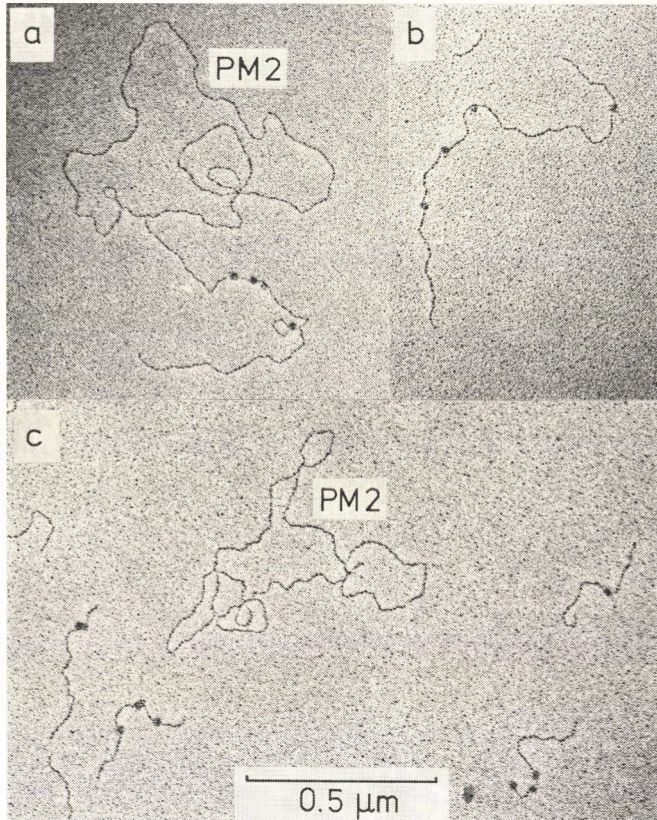
gént (*rrnB*) először egy transzdukáló fágból kiindulva (9), majd ugyanezt a gént a bakteriális genomból kiindulva klónoznunk (1). A klónozott gént és környezetét tovább térképeztük más restriktív enzimek felhasználásával, egészen addig a felbontásig, amely a teljes nukleotidsorrend megállapítását lehetővé teszi.



4. ábra. rRNS géneket tartalmazó DNS fragmentumok elektronmikroszkópos vizsgálata. a) és c) rRNS–DNS heteroduplexek (úgynevezett R-loopok) b) rRNS transzkripció

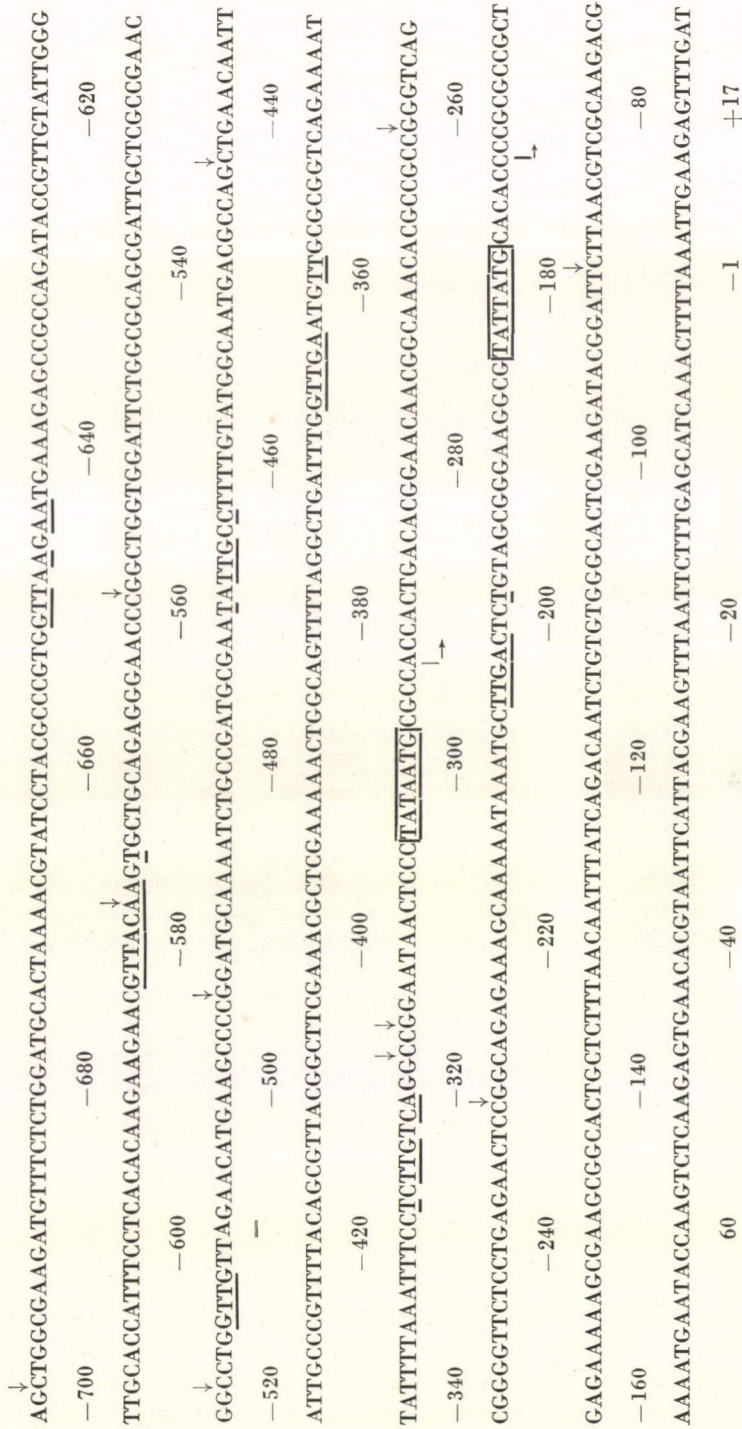
A klónozott DNS szakaszon elektronmikroszkópos módszerrel pontosan lokalizáltuk az érett rRNS molekuláknak megfelelő szakaszok helyét, feltérképeztük a transzkripció startpontjait és megállapítottuk az RNS-polimeráz kötési helyeit (4. és 5. ábra). Ezeket a vizsgálatokat kiegészítettük biokémiai vizsgálatokkal, kisebb DNS-fragmentumok RNS-polimerázkötő képességének meghatározásával (11). Végül a MAXAM–GILBERT-féle módszerrel

meghatároztuk a promoter régió nukleotidsorrendjét (3). Az érett 16S molekulát kódoló génszakaszt megelőző promoter régió 700 bázispárnyi részének szekvenciáját a 6. ábra mutatja. Az ezt megelőző kb. 600 bázispárnyi szakasz szekvenciameghatározása jelenleg még nem fejeződött be.

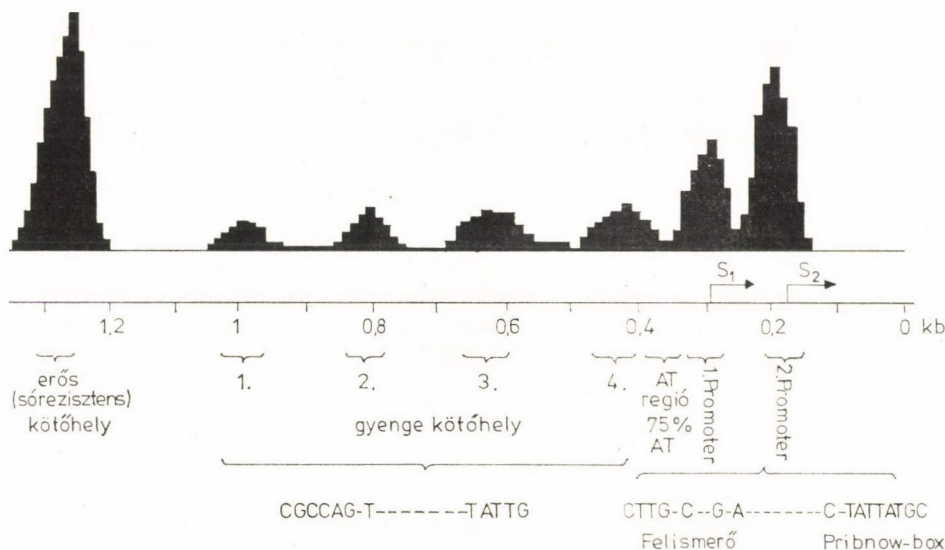


5. ábra. RNS-polimeráz kötése az rRNS géneket tartalmazó DNS fragmentumokhoz. A PM2 fág a DNS molsúlykalibrációhoz szükséges. Mindhárom képen látható a többszörös polimeráz-kötés

Mindezen vizsgálatok alapján a következő kép bontakozik ki a klónozott *rrnB* gén szabályozó régiójáról (7. ábra). Ha az érett 16S rRNS molekulát kódoló szakasz kezdetét tekintjük vonatkoztatási alapnak, akkor e pontnál kb. 200, illetve 300 bázispárral előbb találjuk azt a két helyet, ahol az átírás megkezdődik. A génnek két iniciációs pontja van, egymástól kb. 100 bázispárnyi távolságra, az átírás primér terméke tehát két különböző hosszúságú molekula. Az elsődleges átírási termék további feldolgozása során ez a különbség természetesen eltűnik. Mindkét iniciációs pont előtt olyan szekvenciák



6. ábra. Az *rrnB* gén promoter régiójának nukleotidsorrendje. A nukleotidok számolásának kiindulópontja az érett 16S rRNS-t kódoló szakasz kezdete. A nyílak a szekvenciameghatározások felhasználásának helyeit jelzik. A két megfórt nyíl az rRNS lánc iniciációs pontját. A promoterekre jellemző úgynevezett „Pribnow-box” be van keretezve



7. ábra. Az *rrnB* gén promoterrégiójának sematikus rajza. Legfelül látható a nagyszámú elektronmikroszkópos felvétel kiértékelésével nyert hisztogram a polimeráz-kötésről, alatta a szekvencia releváns elemei

találhatók, amelyek általában jellemzőek az ismert szerkezetű promoterekre (19), tehát kb. 10 bp-vel az iniciációs pont előtt az úgynevezett Pribnow-box (TATAATG, illetve TATTATG) kb. 35 bp-ral előbb pedig az ún. felismerő szekvencia (TTGTCA, illetve TTGACT). E két promotert más szerzők is felismerték, egyéb *rrn* géneknél is (5, 6, 28). A két promoter előtt egy 60–70 bp hosszúságú erősen AT-gazdag régió foglal helyet (kb. 70 % AT). Ez előtt kb. 200 bp-nyi intervallumokban négy gyenge, de elektronmikroszkóposan jól kimutatható polimerázkötőhely található. Ezekon transzkripciót nem indul, közülük eddig kettőnek határoztuk meg a szekvenciáját. Ezek egymáshoz hasonlítanak, de különböznek a valódi promoterektől. Végül: kb. 1300 bázispárral megelőzve a 0 pontot, találunk egy rendkívül erős polimerázkötőhelyet. Itt szintén nem indul transzkripció, de a kötés erősebb mint az „igazi” promotereken.

Ezek az eredmények tehát lényegében megerősítik a kiinduló munkahipotézist, sőt még bonyolultabbá teszik a képet. A két valódi, iniciációra képes promoter előtt van 4 gyenge és egy erős kötőhely. Ezek képesek polimerázt raktározni, és az itt felsorakozó polimeráz molekulák biztosítják, hogy a valódi promoterek (amelyek a szokásos kritériumok szerint tulajdonképpen gyengék), állandóan telítve legyenek és maximális kapacitással dolgozzanak.

Hadd ismétljem el összefoglalásképpen, hogyan született ez a modell. Az *in vivo* észlelt jelenségek (extrém magas transzkripciós ráta) megértése



céljából in vitro rendszerben végeztünk transzkripció és kötési kísérleteket, majd az itt nyert eredmények magyarázatára konstruáltunk egy hipotetikus modellt. A korszerű szerkezetvizsgálat módszereivel megállapítottuk a régió szerkezetét, és az egyes in vitro vizsgálható részfunkciókat hozzárendeltük a struktúrához. A megismerési folyamat befejező láncszeme azonban hiányzik: annak igazolása, hogy valóban ezek a struktúrák felelősek az in vivo funkcióért. Ez a bizonyítás rendkívül nehéz, de nem lehetetlen. A következőkben azt tervezzük, hogy a vizsgált régió irányított módosításával, kémiai, illetve biokémiai eszközökkel előállított pontosan definiált mutációkkal olyan új rekombináns klónokat állítunk elő, amelyek működését összehasonlítva a vad-típussal, funkcionális bizonyítékokat nyerhetünk az egyes szerkezeti elemek szerepére vonatkozóan.

Befejezésül szeretném felsorolni azoknak a munkatársaimnak a nevét, akiknek sokéves kemény munkája áll az itt vázlatosan összefoglalt eredmények mögött: Boros Imre, Csordás-Tóth Éva, Kiss Antal, Kiss Ibolya, Sain Béla, Sümegi János és Udvardy Andor.

## IRODALOM

1. BOROS, I., KISS, A. és VENETIANER, P.: *Nucleic Acids Res.* **6**, 1817 (1979).
2. COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., BOYER, H. W. és HELLING, R. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **70**, 3240 (1973).
3. CSORDÁS-TÓTH, É., BOROS, I. és VENETIANER, P.: *Nucleic Acids Res.* **7**, 2189 (1979).
4. DEBOER, H. A., GILBERT, S. F. és NOMURA, M.: *Cell* **17**, 201 (1979).
5. GILBERT, S. F., DEBOER, H. A. és NOMURA, M.: *Cell* **17**, 211 (1979).
6. GLASER, G. és CASHEL, M.: *Cell* **16**, 111 (1979).
7. JACKSON, D. A., SYMONS, R. H. és BERG, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **69**, 2904 (1972).
8. JACOB, F. és MONOD, J.: *J. Mol. Biol.* **3**, 318 (1961).
9. KISS, A., SAIN, B., KISS, I., BOROS, I., UDVARDY, A. és VENETIANER P.: *Gene*, **4**, 137 (1978).
10. KISS, A., SAIN, B. és VENETIANER, P.: *FEBS Let.* **79**, 77 (1977).
11. KISS, I., BOROS, I., UDVARDY, A., VENETIANER, P. és DELIUS, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **609**, 435 (1980).
12. LEDER, P. és NIRENBERG, M. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **52**, 420 (1964).
13. MAXAM, A. és GILBERT, W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **74**, 560 (1977).
14. MORGAN, E. A., IKEMURA, T. és NOMURA, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **74**, 2710 (1977).
15. NIKOLAEV, N., SILENGO, L. és SCHLESSINGER, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **70**, 3361 (1973).
16. NIRENBERG, M. W. és MATTHÄI, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **47**, 1588 (1961). ;
17. NISHIMURA, S., JONES, D. S. és KHORANA, H. G.: *J. Mol. Biol.* **13**, 302 (1965).
18. PETTIJOHN, D. E., CLARKSON, K., KOSSMAN, C. R. és STONINGTON, O. G.: *J. Mol. Biol.* **52**, 281 (1970).
19. ROSENBERG, M. és COURT, D.: *Anna. Rev. Gen.* **13**, 319 (1979).
20. SANGER, F. és COULSON, A. R.: *J. Mol. Biol.* **94**, 445 (1975).
21. SMITH, H. O. és WILCOX, K. W.: *J. Mol. Biol.* **51**, 379 (1970).
22. SPADARI, S. és RITOSSA, F.: *J. Mol. Biol.* **53**, 357 (1970).
23. SÜMEGI, J., UDVARDY, A. és VENETIANER, P.: *Molec. gen. Genet.* **151**, 305 (1977).
24. UDVARDY, A., SÜMEGI, J. és VENETIANER, P.: *Nature* **249**, 548 (1974).
25. VENETIANER, P., SÜMEGI, J. és UDVARDY, A.: „Control of ribosome synthesis” Munkasgaard, Copenhagen. 1976. (szerk: Maaloe, O. és Kjeldgaard, N. O.)
26. WATSON, J. D. és CRICK, F. H. C.: *Nature* **177**, 964 (1953).
27. YANOFSKY, C., DRAPEAU, G. R., GUEST, J. R. és CARLTON, B. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* **57**, 296 (1967).
28. YOUNG, R. A. és STEITZ, J. A.: *Cell* **17**, 225 (1979).