

ÚJABB ADATOK AZ *ESCHERICHIA COLI LAC* OPERONJA TRANSZKRIPCIÓJÁHOZ

SCHLAMMADINGER JÓZSEF¹, DAMJANOVICH SÁNDOR² és SZABÓ GÁBOR¹

Debreceni Orvostudományi Egyetem Biológiai¹ és Biofizikai² Intézete

Bevezetés

Az *Escherichia coli* bélbaktérium tejcukron (laktóz) mint egyedüli szén- és energiaforráson is képes fennmaradni és szaporodni. E diszaharid hasznosításához szükséges enzimek (β -galaktozidáz, galaktozid-permeáz és -transz-acetiláz) termelése gyakorlatilag csak laktóz (vagy valamilyen ezt helyettesítő mesterséges anyag) jelenlétében folyik. Ha valamilyen egyéb szénforrásról a baktériumsejteket tejcukrot tartalmazó táptalajra visszük át, rövid latencia idő után a fent említett, addig csak igen érzékeny módszerekkel, nyomokban kimutatható enzimek termelése megindul és gyors ütemben folyik mindaddig, míg a laktóz el nem fogy a közegből. A β -galaktozidáz a laktóz hasítását, a permeáz sejtbe való bejuttatását végzi (a transzacetiláz szerepe még nem teljesen tisztázott). Ezen enzimek struktúrgénjei egy szabályozási egységhez, a *lac* operonhoz tartoznak, termelésük párhuzamosan indul vagy szűnik meg. A struktúrgének (*Z*, *Y*, *A*) előtti operátor (*O*) génhez kapcsolódik a represszor molekula. (Ennek aminosav sorrendjét az *I*-vel jelzett regulátor gén határozza meg.) A táptalajban megjelenő laktóz által kiváltott enzimindukció úgy magyarázható, hogy ennek hatására a represszor leválik, s mindhárom struktúrgén transzkripciója egyidejűleg szabaddá válik. A transzkripciót végző RNS-polimeráz enzim az *I* és *O* gén között elhelyezkedő DNS-szakaszhoz, a promotor (*P*) génhez kapcsolódik. A keletkezett mRNS policisztronális, azaz mindhárom struktúrgén átírt szekvenciáját tartalmazza.

1973 decemberével a *lac* operon kutatása — úgy hisszük — újabb történelmi dátumához érkezett. Sikerült tisztázni a *lac* represszor fehérje aminosav-sorrendjét [6], a *lac* operátor gén — vagy legalábbis egy jelentős hosszúságú szakaszának — nukleotidszekvenciáját [18], végül, ez utóbbi kiegészítése és alátámasztásaként egy olyan RNS bázissorrendjét, amelynek transzkripciója — valószínűleg — a *P* gén operátor-proximális végétől kezdődött, s így magában foglalja a teljes *O* gént, valamint a *Z* gén első néhány tripletjét [36]. Ezek az eredmények előre jelzik annak közeli lehetőségét, hogy egy operon szabályozásában szerepet játszó tényezőket nemcsak funkciójuk ismerete, hanem mole-

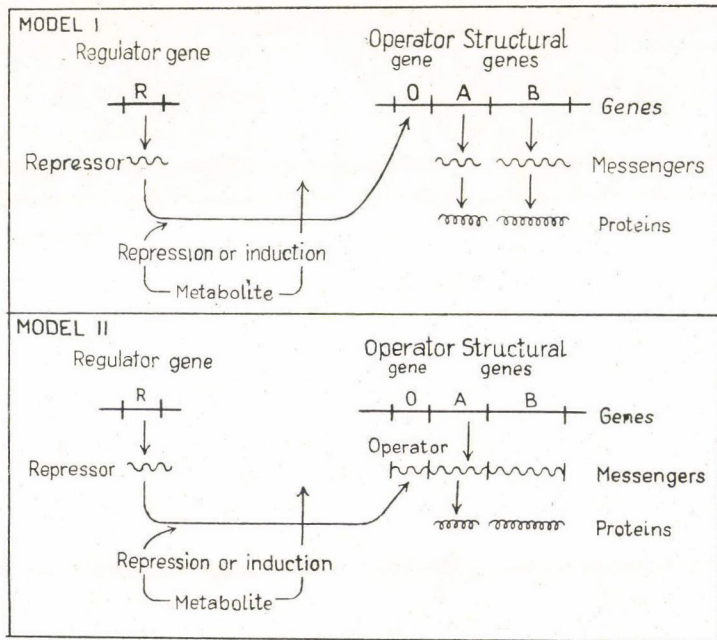
kuláris szerkezetük pontos tisztázása után tehesünk vizsgálat tárgyává, s kölcsönhatásaikat a legobjektívebb módszerekkel tanulmányozhassuk. Aligha kétséges, hogy ezek a kutatások nemcsak a *lac* operonra vonatkozó ismereteink, de az egész molekuláris biológia szempontjából mérföldkövet fognak jelenteni.

Ismereteinknek ez a gyors fejlődése indokolttá teszi, hogy jelen munkánkban áttekintsük a *lac* operon transzkripciójára vonatkozó, ma elérhető legfontosabb adatokat, s ezek megfontolásával értékeljük saját, a transzkripció szabályozására, illetve a promotor gén szerkezetére vonatkozó vizsgálataink eredményeit.

A mai operon modell és kialakulása

Ha a *lac* operonra, annak működésére és szabályozására vonatkozó legfontosabb adatokat áttekintjük, egyszersmind az operonális szabályozásra vonatkozó alapvető ismereteinket is rekapituláljuk, hiszen ismert, hogy ezen szabályozás felfedezése éppen az indukált β -galaktozidáz szintézis tanulmányozásából származott.

JACOB és MONOD [23] eredeti leírásában (1. ábra) már megkülönbözteti a struktúrgéneket (még A-val és B-vel jelölik) a szabályozó funkciót ellátó DNS szakaszoktól. Az eredeti modellben a represszor anyag termeléséért felelős *R* gén (ma elfogadott jelölése: *I*) és az ezen anyag támadáspontjaként szol-



1. ábra. JACOB és MONOD eredeti operon ábrájának faksimilije

gáló *O* gén között folytonosságihiány van: genetikai kísérletekből már egyértelmű volt, hogy itt nem szorosan egymást követő génekről van szó, ugyanakkor még nem tudták, hogy milyen hosszú DNS szakasz választja el egymástól ezt a két egységet, s annak mi a funkciója? A Jacob—Monod modell már egyértelmű magyarázatot tudott adni arra, hogy milyen tényezők és mechanizmusok játszanak szerepet abban, hogy a megfelelő tápanyag és induktor molekula: a laktóz*, ill. a kutatásban sokkal hasznosabbnak bizonyult mesterséges induktorok (izopropil- β -D-tiogalaktozid = IPTG, ill. metil- β -D-tiogalaktozid = TMG) távollétében miért nem történik transzkripció a struktúrgéneken, ill. ezen induktorok hozzáadása milyen mechanizmussal teszi lehetővé az RNS, s ezáltal a megfelelő enzimek szintézisének megindulását. A Jacob—Monod-féle operonelmélet nemcsak az indukált β -galaktozidáz szintézis, nemcsak egyéb indukálható enzimek szintézise, hanem a represszív típusú szabályozás magyarázata szempontjából is sikeres teóriának bizonyult, s nemcsak az *Escherichia coliban*, hanem más baktériumok vonatkozásában is.

Az operon-elmélet megtermékenyítően hatott a magasabbrendűek génregulációjának tanulmányozására is, még ha itt az igazolódott is be, hogy nem alkalmazható közvetlenül az eucelluláris szisztémákra [60].

Magának az operon-elméletnek megteremtése után a következő nagy horderejű, s egyben JACOB és MONOD elképzelését igazoló felfedezés a *lac* represszor izolálása volt (GILBERT és MÜLLER-HILL 1966, [19]). Mielőtt ez megtörtént volna, ezen anyag kémiai mibenlétéről igen eltérő nézetek kerültek forgalomba. Sokan hajlottak arra, hogy ennek RNS-nek, de legalábbis RNS-tartalmú fehérjének, ribonukleoproteidnek kell lennie, másként ugyanis nem tudták elképzelni specifikus kapcsolódását a DNS-hez [43]. Az izolált anyag vizsgálata végül is a tiszta protein teória híveinek adott igazat. Ez az alloszterikus fehérje specifikusan képes felismerni a *lac* operátor gént, ehhez való kötődési konstansa több nagyságrenddel meghaladja az egyéb, nem specifikus DNS szakaszokhoz való kötődését [33], ugyanakkor induktor (pl. IPTG) hozzáadására elveszti affinitását a *lac O* gén iránt, kötődni nem tud, ill. kötött állapotából ledisszociál [20].

A fentiek alapján a szabályozás úgy képzelhető el, hogy a regulátor gén (*I*) a represszor struktúrgénje. Transzkripciója folyamatosan (és lassan) történik, melynek eredményeként az *E. coli* sejtben állandóan kb. 10 db represszor molekula található *I* génenként [40]. Ezek közül egy folyamatosan az *O* génhez kapcsolódva gátolja a mögöttes struktúrgének transzkripcióját. Erre a kapcsolódásra legújabban STEITZ és mtsai [59] dolgoztak ki modellt. A represszor-operátor komplex *in vivo* fél életidejét 30 percre teszik, *in vitro* a bomlási idő 10^4 másodperc [20]. Ebből következik, hogy a represszor-operátor kapcsolat időnként spontán oldódik, melynek eredményeként egy-egy RNS-

* Ma már tudjuk, hogy a laktóz maga nem induktor, előbb át kell alakuljon allolaktózzá [28].

polimeráz molekula végighaladhat a struktúrgéneken. (Feltételezhetjük, hogy ez a DNS-replikációval kapcsolatban is megtörténhet.) Az így szintetizált policisztronális mRNS translációja révén mindig számolnunk kell néhány β -galaktozidáz, s kevesebb galaktozidpermeáz és tiogalaktozid transzcetiláz molekula jelenlétével. Ezek közül a membránban jelenlevő permeáznak fontos szerepe van az indukció létrejöttében, ez juttatja be ugyanis az induktor molekulákat a sejtbe. Hiányában indukció nem, illetve csak a szokásosnál lényegesen magasabb induktorkoncentráció mellett jön létre [30]. Ha induktort adunk a tenyészetbe, s ennek molekulái a sejtben kellő töménységet érnek el, a represszorhoz kapcsolódó induktormolekula annak konformációját úgy változtatja meg, hogy az tovább az *O* gén nukleotidszekvenciáját felismerni és ahhoz kapcsolódni nem képes, s leválásával megszűnik az az (egyszerűen csak mechanikus?) akadály, amely gátolta az RNS-polimeráz végighaladását a struktúrgéneken, azaz az operon transzkripcióját. Ennek eredménye a kiindulási értékhez képest kb. ezerszeres enzimszint emelkedés: az enzimindukció.

Ha az induktor elfogy (természetes induktor esetén), vagy eltávolítjuk (mesterséges induktor kimosása a sejtből), a represszorról ledisszociált induktor hatásának kiiktatásával ez a fehérje visszanyeri aktív konformációját s újból kapcsolódni tud az *O* génhez, megakadályozva a további transzkripciót. Ismeretes a mesterséges induktorok kompetitív antagonistája is: az *o*-nitrofenil- β -*D*-fukozid (ONPF). Ez ötvenszeres töménységben adva képes leszorítani az IPTG-t a represszorról, ugyanakkor maga nem okoz olyan konformációváltozást, ami gátolná a represszor-operátor kötődést [27].

Kísérleti körülmények között az esetek túlnyomó többségében olyan induktorkoncentrációt alkalmaznak, amely maximális enzimindukciót eredményez. Így a jelenlevő induktor mennyisége nem limitáló tényező és a szabályozás fent vázolt sémája „minden vagy semmi” típusúvá válik: lehetővé teszi vagy teljesen gátolja a *lac* operon kifejeződését, expresszióját. Nem kapunk azonban magyarázatot arra a kísérleti tényre, hogy ez az expresszió a tenyésztési körülményektől függően változhat anélkül, hogy ezen körülmények az induktor bejutását a sejtbe megakadályoznák. Ha specifikus aktivitást határozunk meg, sejtszáranyagra vagy fehérjeprodukcióna vonatkoztatva adjuk meg a β -galaktozidáz termelést, különböző szénforrásokon tartva a bakteriumokat, igen eltérő szintézis-sebességet kapunk. Glükózon végezve a tenyésztést (jó szénforrás) pl. sokkal kisebb intenzitású a β -galaktozidáz produkció, mint ha glicerinen (gyengébb szénforrás) növesztjük a sejteket. Ezt a jelenséget jelöli az irodalom katabolit represszióként [35], más terminológia szerint permanens represszió [38, 39]. Ha glicerinen növe, indukált sejtekhez adunk glükózt, a β -galaktozidáz szintézise egy időre csaknem teljesen leáll, majd lassan újra indul, üteme fokozódik mindaddig, míg el nem éri a glükózra jellemző értéket. Ezt a típusú, majdnem teljes, de csak átmeneti gátlást nevezik tranzitórius represszióknak [35].

Ezen két represszió-típus létrejöttének magyarázatára számtalan, utólag helytelennek bizonyult magyarázat született. Ezek közül érdemes talán megemlíteni azt a verziót, amely szerint a glükóz, ill. inkább valamelyik metabolitja (mivel nemcsak glükóz válthat ki repressziót) korepresszorként kapcsolódna a represszor fehérjéhez, az induktor jelenlétében is visszaállítva annak aktív, az *O* gént felismerni és ahhoz kapcsolódni képes konformációját [15]. Mások külön represszort tétéleztek fel, amely az induktorral nem befolyásolható, de valamilyen katabolikus metabolit kapcsolódása révén az *O* gén felismerésére és az ahhoz való kapcsolódás révén a mögöttes struktúrgénekben a transzkripció gátlására képessé válik. Ezen feltételezett represszor struktúrgénjének helyét is meghatározták az *E. coli* kromozómán [34, 62].

Két felfedezés azonban teljesen világossá tette, hogy nem erről van szó. Ezen felismerések meghagyták az *I* gén \rightarrow represszor fehérje \rightarrow *O* gén szisztema fent ismertetett típusú szabályozási mechanizmusát, s emellé rendelték az expresszió mértékét meghatározó promotor gén \leftarrow CAP + cAMP rendszert [46, 47, 63]. A CAP rövidítés a catabolite activator protein névből ered [68], említi az irodalom CGA = catabolite gen activator protein, ill. CRP = cAMP receptor protein néven is [16]. (cAMP = ciklikus adenzin-3',5'-monofoszfát.)

Már JACOB munkacsoportja feltételezte korábban, hogy kell lennie az operonban egy specifikus helynek, ahová az RNS-polimeráz kötődni tud. Ezt a DNS szakaszt ők promotornak (angolban promoter) nevezték és az *O* és *Z* gén közé lokalizálták [24, 25]. BECKWITH és munkatársai utóbb tisztázták, hogy a promotor, a *P* gén az *I* és *O* között foglal helyet [22], s ma már biztosra vehetjük, hogy az *I* közvetlenül kapcsolódik a *P*-hez, ez úgyszintén közvetlenül az *O*-hoz, ez is a *Z*-hez, stb. Az RNS-polimeráz ehhez a promotor DNS szakaszhoz kapcsolódhat, de mindaddig nem kezdheti meg a transzkripciót, míg a mögöttes operátor lókuszhoz a represszor kapcsolódik.

PASTAN munkacsoportja tisztázta, hogy a *P* és *O* génhez tartozó DNS szekvenciák egymást át nem fedők, azaz a represszornak az *O* génhez kötődése nem befolyásolja az RNS-polimeráz *P*-hez való kapcsolódását [10].

A katabolite represszióra vonatkozó munkák révén kiderült, hogy mind a tranzitórius, mind a permanens represszió kivédhető megfelelő mennyiségű cAMP adásával [46, 47, 63]. (Ez egyúttal azt is jelenti, hogy ezek valamilyen közös hatásmechanizmus alapján jönnek létre, így indokolt az a terminológiai felfogás, hogy az általánosabb értelmű katabolite repressziókn belül különböztetnek meg tranzitórius és permanens típust.) A cAMP hatásmechanizmusának tisztázásában PASTAN és PERLMAN munkacsoportja szerzett kiemelkedő érdemeket. ZUBAY és mtsai kidolgozták a megfelelő *in vitro* transzkripcióstranzlációs rendszert a *lac* operonra [2]. Ezt tovább fejlesztve PASTAN és PERLMAN *in vitro* rendszere a specifikus *lac* mRNS minőségi azonosítását és mennyiségének mérését tette lehetővé [14]. Így sikerült egyértelműen bizonyítani, hogy a *lac* operon normális, szabályozott transzkripciójához a meg-

felelő DNS szakasz mellett RNS polimerázra (a holoenzimre és az ennek működéséhez szükséges molekulákra), cAMP-re, CAP-re és a *lac* represszor jelenlétében induktorra van szükség [13].

Adatok a promotor szerkezetéhez és funkciójához

A további vizsgálatok alapján az a kép alakult ki a *P* génről, hogy az két szakaszra osztható: az *I* génhez kapcsolódó vége szolgál a CAP-nak felismerési helyül, s ennek kötődése teszi lehetővé az *O* génhez közelebbi szakaszon az RNS-polimeráz kötődését [5, 45]. A *lac* operon expressziójának mértékét a percnkénti mRNS iniciálások száma szabja meg, ezt pedig a CAP befolyásolja. Ez az alloszterikus protein az intracelluláris cAMP szintre érzékeny, azaz végső soron az expresszió mértéke ez utóbbitól függ [46].

Más katabolikus enzimek szintéziséért felelős, katabolit represszióra érzékeny operonok esetében ugyanezt találták. Ezek expressziója glükóz adására — amely az effektív intracelluláris cAMP szintet csökkenti [46] — ugyanúgy változott, mint a *lac* operoné, s ez a hatás exogén cAMP adásával ugyanúgy kivédhető volt [44]. Adenilát cikláz mutánsok, amelyek cAMP koncentrációja a citoplazmában genetikailag alacsonyabb, egyformán csökkent mértékben termelték minden katabolit represszióra érzékeny enzimüket, ill. tökéletesen adenilát cikláz negatív törzsek, amelyek egyáltalán nem képesek a cAMP szintézisre, kizárólag a táptalajhoz adott cAMP jelenlétében képesek olyan szénforrásokon növekedni, amelyek hasznosításához indukálható, katabolit represszióra érzékeny enzimek szintézise szükséges [48].

A promotor gén—CAP + cAMP rendszer funkciójára vonatkozó vizsgálatok

Saját, alább ismertetendő vizsgálataink a promotor gén—CAP + cAMP rendszerre irányultak és irányulnak. Adatokat kívántunk nyerni arra, hogy szénhidrátokon kívül más anyagokkal is kiváltható-e katabolit-, ill. katabolit típusú represszió? Ismeretes az irodalomból [9], hogy a teofillin kompetitív gátlószere a cAMP bontásáért felelős cAMP-foszfodiesteráz enzimnek emlős rendszerekben. Kézenfekvő volt ugyanennek a lehetséges hatásnak megvizsgálása *E. coli*-ban is.

K12 vad típusú sejteket használva azt találtuk, hogy a teofillin 5×10^{-3} M koncentrációban adva az indukált sejtekhez, tranzitórius repressziót okoz, amely 10^{-3} M cAMP-vel majdnem teljesen kivédhető [52]. Hasonló eredményeket kaptunk koffeinre és teobrominra is (SCHLAMMADINGER és SZABÓ, nem közölt adatok). A teofillin támadáspontjának pontosabb meghatározásakor azt találtuk, hogy az a *lac* operon transzkripcióját gátolja, s hatását a cAMP ugyanezen szinten védi ki [56]. Ez jól egybevág azzal az adattal, amit a glükóz-represszióra közöltek, melyről szintén sikerült bizonyítani, hogy a transz-

kripció szintjén realizálódik, s ugyanezen szinten gátolható cAMP-vel [26]. Ez a fentiek alapján, mai ismereteink fényében már magától értetődő.

Kísérleteinkben nem észleltünk olyan jelenséget, amely arra utalt, hogy a teofillin az *E. coli* cAMP-foszfodiesterázt gátolta volna. Ekkor ugyanis nem gátlást, hanem fokozást, vagy az egyéb módon kiváltott katabolit represszió fokának csökkentését (ill. esetleg kivédését) kellett volna tapasztalnunk. Közleményünkkel [52] egyidejűleg azonban ABOUD és BURGER [1] ilyen értelmű eredményeket tett közzé, más *E. coli* törzset és a miénktől eltérő kísérleti feltételeket alkalmazva.

További kísérleteinkben egy másik, szintén emlős cAMP-foszfodiesteráz gátlóként leírt [58], a Ro 20-1724 jelű [4-(3-butoxi-4-metoxibenzil)-2-imidazolidonin, Hoffman—La Roche] anyagot tettük vizsgálat tárgyává. Ez 10^{-3} M koncentrációban szintén katabolit típusú repressziót okozott. Ugyanakkor glükózzal és cAMP-vel együtt adva az utóbbi hatását fokozta, ami arra utal, hogy a mi *E. coli* K12 törzsünk is rendelkezik cAMP-foszfodiesteráz aktivitással, amit a Ro 20-1724 gátolni tud [55].

Mind a teofillin, mind a Ro 20-1724 mint cAMP analógok, egyúttal — vizsgálataink alapján valószínűsíthetően — versengeni tudnak ezen nukleotid kötőhelyéért a CAP-n is, s ezáltal képesek csökkenteni a *lac* operon expresszióját, az indukált β -galaktozidáz szintézisét. A transzkripció rátájának csökkenése cAMP-nek a táptalajhoz való adásával kivédhető. Mindenesetre ezen anyagok esetében a közvetlen vetélkedést feltételezhetjük. Ugyanakkor még ma sincsenek egyértelmű adataink a glükóz és más szénhidrátok katabolit repressziót kiváltó hatásának pontos hatásmechanizmusáról.

E fent ismertetett kísérleteink végzése közben többször is felmerült a transzkripció rátája mérésnek szükségessége. Ehhez kiválóan alkalmasnak ígérkezett a KEPES által ajánlott induktor kihígításos módszer [31], amely lényegesen gazdaságosabb az indukciónak az IPTG kompetitív antagonistája, az ONPF által való felfüggesztésnél. Az ezzel a módszerrel kapott megbízhatatlan eredmények készítették utávizsgálatokra, hogy valóban lehetséges-e a mesterséges induktor intracelluláris koncentrációjának olyan fokú csökkentése a tenyészet ajánlott 50-szeres felhígításával, amely az indukált állapot megszűntéhez vezet. Eredményeink egyértelműen azt bizonyították, hogy ez Y^+ , permeáz tartalmazó törzsben lehetetlen [54]. Az ilyen sejtekben jelenlevő *lac*-permeáz működése révén — ha az intracelluláris induktorkoncentráció időleges csökkenése be is következik, — a táptalajban a hígítás következtében igen alacsonnyá vált induktorkoncentráció mellett is lehetséges az induktor olyan fokú akkumulálása, hogy a transzkripció — ha alacsonyabb intenzitással is — tovább folyhasson. Utólag visszakövetkeztetve arra a meggyőződésre jutottunk, hogy akkor és abban az esetben voltak sikeresek az ilyen jellegű kísérletek Y^+ törzsekkel, ha a kihígítás glükózt tartalmazó közegben történt. Ez esetben viszont a transzkripciót gátló — és megfelelően nagy glükóz kon-

centráció mellett a rövidebb kísérletek egész ideje alatt ható — effektus a cAMP rendszeren keresztül, a promotor génre irányult.

A promotor gén szerkezetére vonatkozó vizsgálatok

Kísérleteink másik iránya a promotor gén szerkezetére vonatkozó adatgyűjtés.

Több próbálkozás is ismert az irodalomból, amelyek a reguláló szerepet betöltő génnek bázisösszetételének meghatározására irányultak. Így LE TALAER és JEANTEUR [32], valamint mások is, *in vitro* rendszereken végzett vizsgálatok, valamint elméleti megfontolások alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az RNS-polimeráz mint „melting protein” [21], preferenciálisan kapcsolódik AT-gazdag szegmentumokhoz, ahol a DNS kettős spirál szétválasztása energetikailag könnyebb, mert az AT-párokat csak két H-kötés stabilizálja, szemben a GC-párok három H-kötésével.

LIN és RIGGS [33] a *lac* operátor gént tartották AT-gazdag karakterűnek.

Elméletileg a struktúrgének és a hasonló funkciót betöltő *I* gén nukleotidsorrendje — ha a genetikai kód degeneráltsága miatt nem is egyértelműen — az általuk determinált fehérje aminosavsorrendjének meghatározása révén visszakövetkeztethető. A fehérje-információt nem tartalmazó génekről viszont azt mondhatjuk, hogy specificitásuk annál inkább biztosítható, ha véletlenszerűen sem fordul elő bennük olyan nukleotid-szekvencia, amely valamely struktúrgénben is meglehet. Ez könnyen megvalósítható úgy, ha bázisösszetételük jelentősen eltér az organizmusra jellemző értéktől, azaz valamely bázispár javára eltolt. Így egy AT-gazdag szekvencia mind termodinamikailag, mind a genom többi részével való összetéveszthetlensége miatt valóban megfelelhet az RNS-polimeráz felismerési- és kötési helyéül.

A reguláló, vagy általánosabban: a transzlációra nem kerülő DNS szakaszok közül az *E. coli*-ban a legkevésbé specifikus az RNS-polimeráz kötőhelyként szolgáló, promotor funkciót ellátó szekvencia kell legyen. Ez ugyanis minden operonban elő kell forduljon, ugyanakkor minden előfordulási helyén ugyanaz az enzim kell felismerje, mivel mai ismereteink szerint az *E. coli* és általában a baktériumok csak egy DNS-függő RNS-polimeráz fajtával rendelkeznek [4].

Ennél nagyobb fokú specificitást kell mutasson a promotornak az a szakasza, amely a CAP kapcsolódási helyeként szolgál. Ez a szakasz ugyanis meg kell legyen mindazon katabolikus enzimeket kódoló operonok promotor régiójában, amelyek egyformán a CAP + cAMP rendszer kontrollja alatt állnak, de csak ezeken a helyeken és nem minden promotor funkciót ellátó génben. Nincs tudomásunk arról, hogy az ismert CAP-on kívül többféle katabolit aktivátor protein is létezne az *E. coli*-ban. Ugyanakkor nagyszámú egyéb operont ismerünk, amelyekről nem sikerült ezt a szabályozási formát kimutatni.

Hogy ezeknél csak az RNS-polimeráz kötőhelyből áll-e a promotor, s nincs egy ezt megelőző, valamely egyéb reguláló fehérje számára szolgáló felismerési hely, azt ma még nem ismerjük. Nem tartjuk lehetetlennek, hogy más, a CAP-hez hasonló szerepű proteint is fel fognak fedezni, amely az operonok egy más osztálya transzkripciójának szabályozásában játszik szerepet. (Ezen nézetünket alátámasztja MAGASANIK munkacsoportjának legújabb közlése [61], akik *Salmonella typhimurium* hut operonja transzkripciója tanulmányozásakor nemcsak a CAP + cAMP komplexet, hanem egy enzimet, a glutamin szintetázst is aktiváló hatásúnak találták.)

Ugyanakkor — az *in vitro* kísérletek eredményei alapján [17] — nem zárható ki, hogy önmagában a sigma faktor is elég a specifikus kötődéshez és a transzkripciónak a kodogén láncon történő iniciálásához. Ezt látszik alátámasztani az a megfigyelés, hogy megfelelő *in vitro* rendszerben a „core” enzim is képes transzkripcióra, ennek iniciálása azonban bárhol történhet a DNS-en és a kettős spirál mindkét lánc egyforma valószínűséggel kerül átírásra. Sigma faktor hozzáadása az ilyen szisztémához egymagában is biztosította az átírást, valamint ennek iniciálása specifitását. (Részletesebben I. DAMJANOVICH és mtsai [12], a megelőző közleményben).

Végezetül a *lac* operon — és természetesen minden egyéb operon reguláló funkcióban szerepet játszó DNS szakaszaiból a legspecifikusabb az operátor gén kell legyen. Ez olyan egyedi nukleotid szekvencia, amely sehol másutt nem fordulhat elő a genomban, sőt igen hasonló régió sem, véletlenszerűen valamely fehérjekódot tartalmazó struktúrgénben sem. Felismerési helyként kell szolgálgjon, egy, a saját operonra specifikus represszor fehérjének, de ugyanakkor semmilyen más fehérjének. E represszor fehérje kötődési konstansa az operátor génhez sokszorososa kell legyen a sejtben előforduló bármilyen egyéb, tetszőlegesen választott DNS szekvenciához való kötődési affinitásának. A *lac* represszorra vonatkozóan konkrét adatok állnak rendelkezésünkre, melyek szerint kötési konstansa az operátorhoz 10^{11} – $10^{12} M^{-1}$, más természetes vagy mesterséges dezoxiribopolinukleotidokhoz 3–4 nagyságrenddel kisebb. Ezen specifitás, valamint genetikai kísérletek alapján a *lac O* gén hosszúságát 20–50 nukleotidpárra becsülték, valamint feltételezték a specifitást tovább fokozó szimmetrikus voltát [49]. A bázisösszetételt illető AT-gazdagságra vonatkozó adatot [33] a magunk részéről úgy értelmeztük, hogy kb. 1/3 részben GC-pároknak is kell benne szerepelniük, ahhoz, hogy elég specifikus lehessen a represszor-operátor kapcsolódás. Kísérleti rendszerünk és a rendelkezésre álló, ill. megszerezhető mutánsok alapján reálisnak látszott, hogy a promotor gént szerkezetére vonatkozóan nyerhessünk adatokat, az irodalomból ismert, fent felsorolt eredmények alapján.

WEISBLUM és DE HASETH [64] és mások [42] munkája nyomán, amelyben a modern kromoszóma fluoreszcens sávtechnikában használatos quinacrin kötődésének specifitását vizsgálták, ismertté vált, hogy ez az anyag preferen-

ciálisan kötődik a DNS AT-gazdag régióihoz. A quinacrin akridin származék, s az akridinekről, mindenekelőtt a proflavinról már régen ismert, hogy a transzkripciót gátolják [11], interkalálódva a DNS kettős spirálban a hossz tengelyre merőlegesen elhelyezkedő bázispárok közé [21]. A transzkripció gátlására általában a proflavint használták, 100 $\mu\text{g/ml}$ töménységben [11].

Kísérleteinkben a quinacrin egyre csökkenő dózisaik hatását vizsgáltuk az *E. coli* K12 vad típusú törzs indukált β -galaktozidáz szintézisre. Sikerült kimutatnunk, hogy igen alacsony — 10 $\mu\text{g/ml}$ körüli — koncentrációknál ez a festék már nem befolyásolja a sejtekben folyó RNS- és fehérjeszintézist, de még mindig elég kifejezetten gátolja a β -galaktozidáz termelését, azaz a *lac* operon transzkripciója, ebből következőleg a *lac P* gén érzékenyebb a quinacrin gátlására, mint egyéb operonok. Hogy a festék támadáspontját valóban a promotor régióban kell keresnünk, azt alátámasztotta további megfigyelésünk, miszerint az *E. coli* CA 8050 törzsben, amely promotor mutáns, a P_{UV5} jelű mutációval rendelkezik, az indukált β -galaktozidáz termelés nem volt fokozottan érzékeny a quinacrinra [53].

További munkánkban ezért különböző promotor mutáns törzseket tettünk vizsgálat tárgyává. Eredményeinket az 1. táblázat foglalja össze, az irodalmi adatok alapján [3, 50, 66] megszerkesztett promotor térképet a 2. ábra mutatja.

I. táblázat

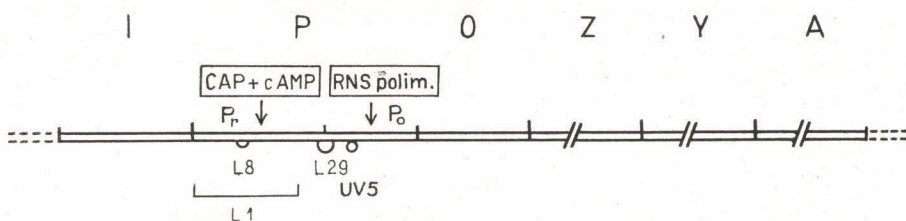
Különböző *E. coli* törzsek β -galaktozidáz termelése

Törzs ^a	Vonatkozó genotípus	Az indukált galaktozidáz szintézis differenciális rátája	
		a legmagasabb quinacrin koncentráció mellett, amely még nem gátolja az általános fehérjeszintézist, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva ^b	kezeletlen tenyészetek esetén, a K 12 vad típushoz viszonyítva ^c
K 12	<i>lac</i> I ⁺ P ⁺ O ⁺ Z ⁺	57 — 65%	100,0%
CA 8001	HfrH <i>lac</i> ⁺ P _{L1} ⁻	53 — 70%	1,9%
CA 8003	HfrH <i>lac</i> ⁺ P _{L8} ⁻	75 — 76%	3,0%
CA 8019	HfrH <i>lac</i> ⁺ P _{L29} ⁻	95 — 100%	49,4%
CA 8224	HfrH <i>lac</i> ⁺ P _{UV5} ^r	98 — 105%	47,6%

^a A promotor mutáns törzsek Prof. Jonathan R. Beckwithtől származnak, akit e helyen is köszönet illet ezek rendelkezésünkre bocsájtásáért.

^b Három párhuzamos kísérlet legalacsonyabb és legmagasabb értékei.

^c Három párhuzamos kísérlet átlagai.



2. ábra. A lac operon vázlata, a promotor mutációk feltüntetésével

A vizsgált törzsek quinacrin-érzékenyséjük alapján két csoportra oszthatók. A K12 (vad típus), CA 8001 (promotor mutáns, L1 delécióval) és a CA 8003 (L8 jelű promotor mutáció) egyaránt fokozottan érzékenyek. A CA 8019 (L29 jelzésű promotor mutáció) és a CA 8224 (szintén az UV mutációt hordozza) törzsekben viszont nem mutatott különbséget a β -galaktozidáz és általános fehérjeszintézis quinacrinérzékenysége.

A promotor mutánsoknak ez a kétféle viselkedése jól egyezik a mutációk kétféle lokalizációjával. Az L1 és L8 jelű mutációk a promotor gén „első”, az I génhez kapcsolódó felét érintik, azt a területet, ahová a CAP + cAMP komplex kapcsolódik (az ábrán P_r-rel jelöltük). Az L29 és UV5 mutációk viszont a gén „második”, az O génhez kapcsolódó felében helyezkednek el, azon a területen, amely az RNS-polimeráz felismerési szekvenciájául szolgál, s ezen belül is e szakasz elején.

Elfogadva azt a megállapítást, hogy a quinacrin preferenciálisan az AT-gazdag régiókhoz kötődik, arra a következtetésre kell jussunk, hogy a P gén második (az ábrán P_o-val jelölt), RNS-polimeráz kötő felének kezdeti szekvenciája ilyen bázisösszetételű. Ez egyébként jól egybevág más szerzők fent említett azon eredményeivel, miszerint ez az enzim AT-gazdag szakaszokhoz mutat kötődési affinitást. Megfigyelésünk pontosabbá teszi ezen szakasz lokalizációját. Egyelőre sem a P gén teljes hosszát, sem az RNS-polimeráz kötési helyéül szolgáló terület nagyságát nem ismerjük pontosan. BICK és mtsa közleménye alapján mintegy 20 nukleotidapár nagyságrendűnek tarthatjuk [7], ezt támasztja alá NOVAK [41] eredménye is. Mégis jogos az a feltételezés, hogy az enzim a tulajdonképpeni kötőhelyről még előre vándorolhat, mielőtt az operátor régiót elérné, ahol — ha az operon nincs indukált állapotban — elakad. Ezen nézetünket megerősítette WILLMUND és KNESER [65] legújabb közlése, akik λ fág DNS-ébe integrált *E. coli gal* operon promotor régiójára azt találták, hogy az legalább 6 molekula RNS-polimerázt képes egyidejűleg megkötve tárolni — CAP + cAMP jelenlétében. Ugyanakkor ezek távollétében, de ATP + GTP jelenlétében is történt RNS-polimeráz kapcsolódás, ekkor azonban csak egy enzim-molekula volt képes a promotor régióhoz kötődni. BLATTNER és mtsai λ fágon végzett kísérleteik során korábban azt találták, hogy egy promotor mutáció és a mögöttes transzkripciós iniciációs hely között mintegy

200 bázispárnyi távolság volt [8]. Ezen adatok és az RNS-polimeráz által lefedett DNS-szakasz becsült nagysága alapján a *lac* promotor régióról is joggal feltételezzük, hogy a kötődés után az RNS-polimeráz még előre vándorolhat az *O* génig, s hogy egyidejűleg több RNS-polimeráz molekula is helyet foglalhat a *P* gén második szakaszán.

Hogy a sejt ökonómiája megengedi-e az aktuálisan transzkripcióra nem kerülő operonok esetén egy vagy több RNS-polimeráz tárolását az operátort megelőző szakaszon, ez nem ismert. Nincs okunk kizárni azt a feltevést, hogy a kapcsolódó represszor úgy változtatja meg a DNS másodlagos szerkezetét a megelőző szakaszon, hogy ezt a lehetőséget egyúttal kizárja. Az a korábban már említett tény, miszerint a *lac* represszor kötődése nem zárja ki és nem zavarja az RNS-polimeráz *lac P* génhez való kapcsolódását [10], ebből a szempontból nem perdöntő adat. Lehet, hogy egy enzim molekula kötődése lehetséges, de több egyidejű tárolása már nem, s ehhez nem szükséges, hogy a represszor fehérje lefedje a megelőző *P* gén egy szakaszát és térbeli kiterjedésénél fogva zavarja a tárolást.

Kapott adataink további értékelése azonban a promotor funkciójára egyéb következtetések levonását is megengedi. A vizsgált promotor mutáns törzsek nemcsak a mutáció elhelyezkedését illetően sorolhatók két csoportba, amely két csoport egyúttal quinacrin-érzékenységében is jelentősen különbözik egymástól, hanem a quinacrinral nem kezelt kontroll tenyészetek specifikus β -galaktozidáz szintézis ütemében is. Ha a vad típusú törzs produkcióját 100%-nak vesszük, azok a mutánsok, amelyek a CAP + cAMP komplexet kötő szakaszon (az ábrán P_r -rel jelölve) hordoznak mutációt, mindössze 2–3%-nyi β -galaktozidázt termelnek, míg a másik csoportba sorolható sejtek kb. 50%-ot. Ez azt jelentheti, hogy a *lac* operon expressziójának mértéke szempontjából fontosabb az első, mint a második szakasz épsége.

Ennek alapján feltételezzük, hogy a CAP + cAMP komplex kötődése azért kell megelőzze és azért többé-kevésbé nélkülözhetetlen előfeltétele az RNS-polimeráz kötődésének, mert úgy változtatja meg a mögöttes DNS struktúra másodlagos szerkezetét, hogy az alkalmassá válik a transzkripciót végző RNS-polimeráz optimális kötődése és/vagy a *P* gén második szakaszán való előrehaladása számára.

Elképzelésünk szerint a CAP-t kötő hely után közvetlenül következne az az AT-gazdag szekvencia, amely ezt a szerkezetváltozást — akár egy lokális láncszétválás formájában is — elszenvedné, s amely egyúttal felelős volna a fokozott quinacrin-érzékenységért. A megelőző részben (a P_r -ben) bekövetkezett mutáció a CAP kötődésének zavarásával vagy kizárásával ezen terület megfelelő struktúraváltozásának elmaradásával jelentősen csökkenti a *lac* operon expresszióját. Ugyanakkor a quinacrin-érzékenység megmarad. Ha viszont a mutáció az RNS-polimeráz kötőhely (P_0 -val jelzett terület) első szakaszát érinti, úgy változik meg a specifikus szekvencia, hogy a fokozott qui-

nacrin-szenzitivitás elvész, de a megelőző hely (P_7) ép volta és ezáltal a CAP kötőképességének megőrzése elegendő a *lac* operon expressziójához, amit — relatíve kisebb fokban — zavar az RNS-polimeráz kötődés alacsonyabb frekvenciája. Ezen utóbbi kísérleteink folyamatban voltak, amikor megjelent SANKARAN és POGELL [51] közleménye, akik lényegében véve hasonló megfigyelésekről számoltak be. Ők egy másik akridin festék, az akridin orange (a továbbiakban AO) kis dózisaival, valamint etidium bromiddal is végzett kísérleteikben találták a β -galaktozidáz szintézist fokozottan érzékenynek. Kísérleteiket más operonokra is kiterjesztették, vizsgálták a triptofanáz, alkalikus foszfatáz és hexóz foszfatáz szintézist is, s ezek alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az interkalálódó akridin festékek iránti fokozott érzékenység a katabolit represszióra fogékony operonok sajátja.

Ők a fokozott érzékenységet cAMP-vel kompenzálhatónak írják le, míg a mi rendszerünkben ez a ciklikus nukleotid nem bizonyult hatásosnak. A különbség magyarázható az eltérő gátlószerrel, vagy inkább a valószínűleg eltérő genotípusú baktériumtörzsszel. További vizsgálatokat igényel a gátlás specifikusságának tisztázása. Az AO ugyanis irodalmi adatok [64] szerint nem mutat olyan bázisspecifitást, mint az általunk használt quinacrin. Eredményeik magyarázatában az idézett szerzők [51] a mienktől eltérő következtetésre jutnak: nevezetesen a derepresszió következtében létrejövő másodlagos DNS-szerkezet változás zavarásáért teszik felelőssé a festéket. Olyan promotor mutánsokat azonban, amilyeneket mi vontunk be a vizsgálatokba, nem használtak. Saját előzetes kísérleteink szerint az indukált β -galaktozidáz szintézis a fent ismertetetthez hasonlóan fokozottan érzékeny proflavinra is. Ez utóbbiról szintén az AT-gazdag régiókhoz való affinitást írták le [64].

Jóllehet a *lac* represszornak az operátorhoz való kötődése kapcsán a megelőző promotor régióban bekövetkező másodlagos DNS-szerkezet változást mi sem tartjuk kizártnak, a fentiek értelmében nem tartjuk kielégítőnek SANKARAN és POGELL [51] okfejtését — ha a *P* gén hosszát és RNS-polimeráz tárolási funkcióját illetően nem is rendelkezünk még objektív adatokkal — és nem érezzük kellően megalapozottnak ahhoz, hogy saját — fent részletezett — elképzelésünket módosítsuk. Ellenkezőleg, az idézett közleménynek azt a megállapítását, hogy a jelenség a katabolit represszióra érzékeny operonokra korlátozható — amelyek promotoraira közösen jellemző a CAP + cAMP komplex kötődésének szükségessége a transzkripció megindításához — saját kifejtésünk megerősítéseként értékeljük.

A további kutatások perspektívái

Végezetül a legújabb eredmények várható következményeit és folytatását kívánjuk megtárgyalni. GILBERT és munkacsoportja, miután a teljes *lac* operont alkotó DNS-t BECKWITH és mtsai korábban már izolálták [57], először

az *O* gén nukleotidszekvenciáját kezdte analizálni [18]. A metodika alapja egyszerű: a korábban általa izolált *lac* represszor fehérjét [19] köti a DNS-hez. Ez lefedi az operátor területének nagy részét. A fehérjével nem védett részt DN-áze kezeléssel eltávolítja, majd a maradékot leválasztva a represszorról (IPTG adásával), olyan DNS-szakaszhoz jut, amely megfelel az *O* génnek, vagy pontosabban a represszor kötőhelynek. Ennek bázissorrendje közleményük [18] szerint a következő:



Feltűnő, hogy a bázisösszetétel valóban megfelel az előzetes várakozásnak: AT-gazdag szekvencia, kb. 1/3 résznyi GC-vel. (Az analizált szakasz 24 nukleotid-párjából 15 AT és 9 GC.) Az is megfelel az előzetes elképzeléseknek, hogy a szerkezetben szimmetria található: egy hat nukleotid-párból álló résznek, a vizsgált terület 4.—9. pozíciójában, szimmetrikusan megfelel a 19.—24. pozícióban levő szekvencia, e két terület között pedig 4 nukleotid-pár két-két tagja mutat szimmetriát. (E szakaszokat, ill. párokat aláhúzással jelöltük.) Hogy ez a jelenség pontosan milyen előnnyel jár a sejt számára, az nem ismert. Feltételezhető, hogy a *lac* represszor kapcsolódását, amely 4 azonos monomerből felépülő, feltehetően szimmetrikus térszerkezetű molekula [51], elősegíti: a szekvenciának azon részei, amelyek a fehérje-DNS kötődés szempontjából elengedhetetlenek, lennének szimmetrikus elrendezésűek. Ez a kötődést kétféle pozícióban is lehetővé tenné. Mint említettük, SADLER és SMITH [49] ezt a szimmetriát korábban már feltételezték. A szimmetria ténye egyúttal lényegesen csökkenti a hasonló szekvencia aspecifikus, valamely struktúrgénben való előfordulásának valószínűségét.

Más magyarázat is elképzelhető azonban. Még mindig nem tekinthető véglegesen eldöntött kérdésnek, hogy a *lac* operon transzkripciója *in vivo* hol kezdődik. Míg emlős rendszerekben közismert [60], hogy nem csak a tulajdonképpeni mRNS, hanem egy azt megelőző, relatíve hosszabb DNS-szakasz is transzkripcióra kerül (az így szintetizált RNS-t jelölik dRNS névvel), *E. coli*-ban, ill. általában protocoellulákban ez a kérdés nem véglegesen tisztázott. MILLER a *lac* operonról szóló összefoglalóban [37] úgy foglal állást, hogy az operátor gén is transzkripcióra kerül (ez a lehetőség már JACOB és MONOD eredeti közleményében [23] is felmerült, l. l. ábrát), s MAIZELS alább ismeretendő *in vitro* kísérlete is alátámasztja ezt a nézetet [36]. Elfogadva tehát az *O* gén transzkripcióra kerülését, így olyan RNS szekvencia áll elő, amely önmagával képes kettős spirált kialakítani. Emlős (nyúl reticulocytá) rendszerben végzett vizsgálatok alapján KAEMPFER és KAUFMAN [29] felvetik annak lehetőségét, hogy az IF3 iniciációs faktor, amely általában kettős spirált alkotó nukleinsav felismerésére képes, a translációban egy kettős spirált alkotó

mRNS-t ismerne fel, s ez jelentené az AUG kodon mellett az iniciálás kezdetének, ill. a riboszómák kapcsolódásának helyét.

Az *E. coli lac* operátor régió fenti szerkezetének ismerete alapján tetzetős feltevés lenne a fenti lehetőség alkalmazása a *lac* operon policisztronális mRNS-e translációja iniciálásának specifikus meghatározására. Más szerzők fágokkal végzett kísérletei alapján MAIZELS [36] is utal erre a lehetőségre. MAIZELS [36] eredményei, melyeket egy *lac P_{UV5}* mutáns transzkriptumának szekvenciaanalízisével ért el, tisztázva egy 63 nukleotidából álló szakasz bázissorrendjét, alátámasztják GILBERT és MAXAM [18] fent idézett *O* gén nukleotidszekvenciájának helyességét. A MAIZELS-féle RNS bázissorrend:

pppAAUUGUGAGCGGAUAACAAUUUCACACAGGAAACAGCUAUGA-
 -CCAUGAUUACGGAUUCACUGG

a jelölt helyen (hosszú aláhúzás) ténylegesen megfelel a *lac O* génre közöltnek. A kettősen aláhúzott szakaszok alkalmasak a RNS-en belüli kettős spirál kialakítására.

A jól azonosítható AUG kodon (fölelhúzással jelölve), amely a *Z* gén translációjának kezdetét jelöli, valamint a GILBERT és MAXAM-[18] féle szekvencia végével komplementer RNS nukleotidok közötti szakasz azt jelzi, hogy az *O* génből ugyanennyi bázispárból álló területet nem fedett le a represszor, ekkora szekvencia meghatározása maradt ki az *O* génből GILBERT és MAXAM munkájában. MAIZELS közleményéből [36] viszont visszakövetkeztethető a hiányzó szakasz:

5'—TCACACAGGAAACAGCT3'
 3'—AGTGTGTCCTTTGTCA5'

Azt, hogy a MAIZELS-féle szekvenciában valóban a jelzett (felülhúzás) AUG triplet felelős a transláció iniciálásáért, bizonyítja ennek a szekvenciának a β -galaktozidáz ismert N-terminális aminosavsorrendjével való összevetése: Thr-Met-Ile-Thr-Asp-Ser-Leu-Ala-Val-Val-Leu-Gln-Arg [67]. Ennek első hét tagját a következő RNS szekvencia is kódolhatja:

ACCAUGAUUACGGAUUCACUG,

ami viszont tökéletesen megegyezik a MAIZELS által közölt szekvenciában az első AUG kodont követő 7 triplettel.

Közvetett forrásból tudjuk [4], hogy GILBERT munkacsoportja a teljes szekvenciaanalízisre törekszik, munkájukat jelenleg a *P* génre kívánják kiterjeszteni. Ha kísérleteik sikerre vezetnek, fent ismertetett saját eredményeink

is objektív megerősítést nyerhetnek. További feladat, nyilvánvalóan, különböző mutáns törzsek *lac* operonjának izolálása és azok bázissorrendjének meghatározása. Így lesz feltárható az objektív összefüggés egy pontmutáció által okozott szerkezetváltozás és a következményes regulációs hatás molekuláris jelenségei között.

Az egyidejűleg publikált [6] teljes *lac* represszor aminosavsorrend révén pedig lehetőség nyílt arra, hogy pontosan meghatározzák, milyen aminosav-oldalláncok vehetnek részt a *lac O* gén felismerésében, s a represszor specifikus kapcsolódásában. Az így elkészíthető komplett DNS-represszor fehérje modell rendkívül hasznos adatokkal gazdagíthatja majd a DNS-fehérje kapcsolatokra vonatkozó ismereteinket, amelyek mind a protocelluláris, mind pedig — s még nagyobb súllyal — az eucelluláris génregulációban alapvető szerepet játszanak.

IRODALOM

1. ABOUD, M., BURGER, M.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **43**, 174—182 (1971).
2. ARDITTI, E. R., ERON, L., ZUBAY, G., TOCCHINI-VALENTINI, G., CONNAWAY, S., BECKWITH, J.: *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **35**, 437—442 (1970).
3. ARDITTI, R., GRODZICKER, T., BECKWITH, J.: *J. Bact.* **114**, 652—655 (1973).
4. BAUTZ, E. K. F.: *FEBS Letters* **36**, 123—129 (1973).
5. BECKWITH, J., GRODZICKER, T., ARDITTI, R.: *J. Mol. Biol.* **69**, 155—160 (1972).
6. BEYREUTHER, K., ADLER, K., GEISLER, N., KLEMM, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **70**, 3576—3580 (1973).
7. BICK, M. D., LEE, C. S., THOMAS, JR. CH. A.: *J. Mol. Biol.* **71**, 1—9 (1972).
8. BLATTNER, F. R., DAHLBERG, J. E., BOETTIGER, J. K., FIANDT, M., SZYBALSKI, W.: *Nature New Biol.* **237**, 232—236 (1972).
9. BUTCHER, R. W., SUTHERLAND, E. W.: *J. Biol. Chem.* **237**, 1244—1250 (1962).
10. CHEN, B., DE CROMBRUGGHE, B., ANDERSON, W. B., GOTTESMAN, M. E., PASTAN, I., PERLMAN, R. L.: *Nature* **233**, 66—67 (1971).
11. CONDE, F., DEL CAMPO, F. F., RAMIREZ, J. M.: *FEBS Letters* **16**, 156—158 (1971).
12. DAMJANOVICH, S., SCHLAMMADINGER, J., SZABÓ, G.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **19**, 1—9 (1976)
13. DE CROMBRUGGHE, B., CHEN, B., ANDERSON, W., NISSLEY, S. P., GOTTESMAN, M., PERLMAN, R., PASTAN, I.: *Nature New Biol.* **231**, 139—142 (1971).
14. DE CROMBRUGGHE, B., CHEN, B., GOTTESMAN, M., PASTAN, I., VARMUS, H. E., EMMER, M., PERLMAN, R. L.: *Nature New Biol.* **230**, 37—40 (1971).
15. DOBROGOSZ, W. J.: *J. Bact.* **97**, 1083—1092 (1969).
16. EMMER, M., DE CROMBRUGGHE, B., PASTAN, I., PERLMAN, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **66**, 480—487 (1970).
17. FUKUDA, R., IWAKURA, Y., ISHIHAMA, A.: *J. Mol. Biol.* **83**, 353—367 (1974).
18. GILBERT, W., MAXAM, A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **70**, 3581—3584 (1973).
19. GILBERT, W., MÜLLER-HILL, B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **56**, 1891—1898 (1966).
20. GILBERT, W., MÜLLER-HILL, B.: in *The Lactose Operon* (ed. J. R. Beckwith and D. Zipser) 93—109 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1970).
21. VON HIPPEL, P. H., MCGHEE, J. D.: *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 231—299 (1972).
22. IPPEN, K., MILLER, J. H., SCAIFE, J. G., BECKWITH, J. R.: *Nature* **217**, 825—827 (1968).
23. JACOB, F., MONOD, J.: *J. Mol. Biol.* **3**, 318—356 (1961).
24. JACOB, F., ULLMANN, A., MONOD, J.: *J. Mol. Biol.* **13**, 704—719 (1965).
25. JACOB, F., ULLMANN, A., MONOD, J.: *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **258**, 3125—3128 (1964).
26. JACQUET, M., KEPES, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 84—92 (1969).
27. JAYARAMAN, K., MÜLLER-HILL, B., RICKENBERG, H. V.: *J. Mol. Biol.* **18**, 339—343 (1966).
28. JOBE, A., BOURGEOIS, S.: *J. Mol. Biol.* **69**, 397—408 (1972).
29. KAEMPFER, R., KAUFMAN, S.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **70**, 1222—1226 (1973).
30. KENNEDY, E. P.: in *The Lactose Operon* (ed. J. R. Beckwith and D. Zipser) 49—92 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1970).

31. KEPES, A.: *Biochim. Biophys. Acta* **76**, 292—309 (1963).
32. LE TALAER, J. Y., JEANTEUR, PH.: *FEBS Letters* **12**, 253—256 (1971).
33. LIN, S., RIGGS, A. D.: *Nature* **228**, 1184—1186 (1970).
34. LOOMIS, JR. W. F., MAGASANIK, B.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**, 230—234 (1965).
35. MAGASANIK, B.: in *The Lactose Operon* (ed. J. R. Beckwith and D. Zipser) 189—219 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1970).
36. MAIZELS, N. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **70**, 3585—3589 (1973).
37. MILLER, J. H.: in *The Lactose Operon* (ed. J. R. Beckwith and D. Zipser) 173—188 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1970).
38. MOSES, V., PREVOST, C.: *Biochem. J.* **100**, 336—353 (1966).
39. MOSES, V., YUDKIN, M. D.: *Biochem. J.* **110**, 135—142 (1968).
40. MÜLLER-HILL, B., CRAPO, L., GILBERT, W.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **59**, 1259—1264 (1968).
41. NOVAK, R. L.: *Biochim. Biophys. Acta* **195**, 279—281 (1969).
42. PACHMANN, U., RIGLER, R.: *Exptl. Cell Res.* **72**, 602—608 (1972).
43. PARDEE, A. B., PRESTIDGE, L. S.: *Biochim. Biophys. Acta* **36**, 545—547 (1959).
44. PASTAN, I., PERLMAN, R. L.: *Science* **169**, 339—344 (1970).
45. PASTAN, I., DECROMBRUGGHE, B.: in *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology, 5th Symposium: Gene Transcription in Reproductive Tissue* (ed. by E. Diczfalusy) 298—306 (Stockholm, 1972).
46. PERLMAN, R. L., DECROMBRUGGHE, B., PASTAN, I.: *Nature* **223**, 810—812 (1969).
47. PERLMAN, R., PASTAN, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **30**, 656—664 (1968).
48. PERLMAN, R. L., PASTAN, I.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**, 151—157 (1969).
49. SADLER, J. R., SMITH, T. F.: *J. Mol. Biol.* **62**, 139—169 (1971).
50. SANDERS, R., MCGEOCH, D.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **70**, 1017—1021 (1973).
51. SANKARAN, L., POGELL, B. M.: *Nature New Biol.* **245**, 257—260 (1973).
52. SCHLAMMADINGER, J., SZABÓ, G.: *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.* **18**, 55—59 (1971).
53. SCHLAMMADINGER, J., SZABÓ, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **8**, 253—255 (1973).
54. SCHLAMMADINGER, J., SZABÓ, G.: *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.* **20**, 329—332 (1973).
55. SCHLAMMADINGER, J., SZABÓ, G.: *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **9**, 89—91 (1974).
56. SCHLAMMADINGER, J., SZABÓ, G., PÓLYA, L.: *Acta microbiol. Acad. Sci. Hung.* **19**, 43—50 (1972).
57. SHAPIRO, J., MACHATTIE, L., ERON, L., IHLER, G., IPPEN, K., BECKWITH, J.: *Nature* **224**, 768—774 (1969).
58. SHEPPARD, H., WIGGAN, G., TSIEN, W. H.: in *Advances in Cyclic Nucleotide Research* (ed. by P. Greengard and G. S. Robinson) Vol. I. Physiology and pharmacology of cyclic AMP, 103—112 (Raven Press, New York 1972).
59. STEITZ, T. A., RICHMOND, T. J., WISE, D., ENGELMAN, D.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **71**, 593—597 (1974).
60. SZESZÁK F.: *MTA Biol. Oszt. Közl.* **16**, 289—317 (1973).
61. TYLER, B., DELEO, A. B., MAGASANIK, B.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **71**, 225—229 (1974).
62. TYLER, B., WISHNOW, R., LOOMIS, JR. W. F., MAGASANIK, B.: *J. Bact.* **100**, 809—816 (1969).
63. ULLMANN, A., MONOD, J.: *FEBS Letters* **2**, 57—60 (1968).
64. WEISBLUM, B., DE HASETH, P. L.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **69**, 629—632 (1972).
65. WILLMUND, R., KNESER, H.: *Mol. Gen.* **126**, 165—177 (1973).
66. YUDKIN, M. D.: *Biochem. J.* **118**, 741—746 (1970).
67. ZABIN, I., FOWLER, A. V.: *J. Biol. Chem.* **247**, 5432—5435 (1972).
68. ZUBAY, G., SCHWARTZ, D., BECKWITH, J.: *Proc. Nat. Acad. Sci. US.* **66**, 104—110 (1970).

A kézirat a szerkesztőségbe érkezett 1974. június 5-én.