

Megváltoztatott szekvenciaspecifitású DNS metiltransferázok létrehozása és vizsgálata

Ph.D értekezés

Tímár Edit

Témavezetők: Dr. Venetianer Pál

Dr. Kiss Antal

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézet

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK

2016

Szeged

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK	1
I. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
I.1. BEVEZETŐ	4
I.2. A DNS METILÁCIÓ BIOLÓGIAI JELENTŐSÉGE	4
I.2.1. A DNS metiláció jelentősége prokariótákban	5
I.3. A DNS METILTRANSZFERÁZOK	7
I.3.1. A prokarióta C5-citozin metiltranszferázok	8
I.3.2. A C5 metiltranszferázok által katalizált reakció	9
I.3.3. A DNS metiltranszferázok szekvensspecifitása	11
I.3.4. A DNS metiltranszferázok szekvensspecifitásának megváltoztatása	12
I.4. MUTAGENEZIS, <i>IN VITRO</i> EVOLÚCIÓS KÍSÉRLETEK	14
II. CÉLKITŰZÉS	17
III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
Alkalmazott baktériumtörzsek	18
Plazmidok	18
Az <i>in vitro</i> mutagenézis és szelekció során használt plazmidok	18
Az életképességi kísérletekben használt plazmidok	19
Plazmid DNS tisztítás	19
A kísérletek során alkalmazott vegyszerek, enzimek	20
Agaróz gélelektroforézis	20
Fehérjék gélelektroforézise denaturáló körülmények között	20
DNS fragmentum izolálása agaróz gélből	20
Plazmid DNS bejuttatása <i>Escherichia coli</i> sejtekbe	21
A SinI metiltranszferáz gén mutagenézise	21
A DNS keverés	22
Emésztés DNázi-gyel MnCl ₂ jelenlétében	22

Emésztés DNázl-gyel MgCl ₂ jelenlétében	22
Polimeráz láncreakció:	23
Primer nélküli PCR a DNázl emésztéssel kapott M.SinI génfragmentumok közötti rekombináció létrehozására	23
Polimeráz láncreakció az eredeti méretű M.SinI gén visszanyerésére	23
Egyéb polimeráz láncreakciók	23
A mutagenézis és DNS keverés után nyert PCR termékek direkt klónozása	24
A mutagenizált gének szelekciója	24
A mutáns metiltranszferáz fehérjék tisztítása	24
A metiltranszferázok aktivitásának mérése	25
DNS szekvenciameghatározás	26
A baktériumsejtek GGNCC specifikus endonukleázzal szemben mutatott életképességének vizsgálata	27
A Sau96I endonukleáz aktivitásának mérése nyers sejt kivonatból	28
IV. EREDMÉNYEK	29
IV.1. A vad típusú M.SinI gén mutagenézise, a mutáns gének fragmentumainak újrendezése (DNS keverés)	29
IV.1.2. A mutáns M.SinI gén izolálása	29
IV.2. A mutáns M.SinI gén jellemzése	30
IV.2.1. A belső és az N-terminális mutációk szétválasztása	32
IV.2.2. A Leu214Ser, Tyr229His aminosavcseréket hordozó mutáns enzim tisztítása, jellemzése	33
IV.3. A vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek GGWCC és GGNCC specifitású endonukleázzal szembeni rezisztenciájának vizsgálata	36
IV.3.1. A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó plazmidok metiláltsági állapota	37
IV.3.2. Baktériumsejtek GGWCC specifitású endonukleázzal szembeni rezisztenciája in vivo kísérletben	38
IV.3.3. A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek GGNCC specifitású endonukleázzal szembeni rezisztenciája in vivo kísérletben	39
IV.4. A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképességének vizsgálata szabályozható expressziójú GGNCC specifitású endonukleázzal szemben	40
IV.4.1. A sejten belüli arabinózkoncentráció szinkronizálása	41
IV.4.2. A sejten belüli Sau96I endonukleáz szint	42
IV.4.3. A vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképességének vizsgálata szabályozható expressziójú GGNCC specifitású endonukleázzal szemben	43
IV.5. A DNS ligáz hatása az endonukleázt tartalmazó sejtek életképességére	45

V. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	48
V.1. Megváltozott specifitású SinI metiltransferáz előállítás random mutagenézissel	48
V.2. A mutáns metiltransferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképességének vizsgálata különböző specifitású endonukleázokkal szemben	50
VI. ÖSSZEFOGLALÓ	55
VI.1. A mutáns SinI metiltransferáz izolálása és jellemzése	56
VI.2. A mutáns SinI metiltransferázok nyújtotta védelem egy szabályozható expressziójú GGNCC specifikus endonukleázzal szemben	57
VI.3. A DNS ligáz hatása	58
VII. SUMMARY	60
VII.1 Selection and characterization of the mutant SinI MTase	61
VII.2 In vivo DNA protection by relaxed-specificity SinI DNA methyltransferase variants	62
VII.3 Effect of elevated level of DNA ligase	63
VIII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66
IX. IRODALMI HIVATKOZÁSOK	67

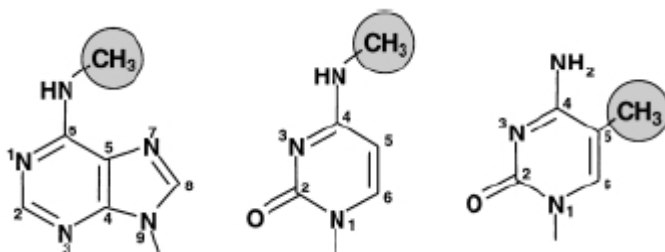
I. Irodalmi áttekintés

I.1. Bevezető

A makromolekuláris kölcsönhatások egyik talán legszebb példája bizonyos fehérjék azon tulajdonsága, hogy képesek a DNS szekvenciaspecifikus felismerésére, módosítására. A sejt életében alapvető, de rendkívül bonyolult folyamatok, mint a DNS replikáció, transzkripció, vagy a DNS-hibajavítás részleteinek felderítéséhez elengedhetetlenül fontos a DNS-fehérje kölcsönhatások ismerete. A DNS-fehérje kölcsönhatások tanulmányozásának kitűnő kísérleti objektumai a DNS metiltransferázok, melyek képesek a DNS molekula szekvenciaspecifikus felismerésére, és módosítására. Előnyük, hogy viszonylag kisméretűek, számos DNS metiltransferáz aminosavszekvenciája ismert, és több enzim röntgendiffrakciós szerkezeti képe is rendelkezésre áll.

I.2. A DNS metiláció biológiai jelentősége

Számos élőlény DNS-e tartalmaz metilált bázisokat (N6-metiladenin, N4-metilcitozin és C5-metilcitozin) a négy általános (adenin, guanin, citozin, timin) bázis mellett. Ezek a metilált bázisok a DNS molekula természetes komponensei, ellentétben azokkal a módosult bázisokkal, melyek alkilálás, vagy oxidatív DNS károsodás során jönnek létre. A DNS metiltransferázok S-adenozil-L-metionint (SAM), mint metil donort használva – szekvenciaspecifikus módon- katalizálják egy metilcsoport beépülését a DNS adenin, vagy citozin bázisaira. Mindhárom metilált bázis esetén a metilcsoport a DNS molekula nagy árkában helyezkedik el, így könnyen felismerhető a DNS-kötő fehérjék számára. A metilált bázisok új, a genetikai kódban nem tárolt, úgynevezett epigenetikus információt adnak a DNS molekulának.



I.

II.

III.

1. ábra : A DNS metiltransferázok által létrehozott módosult bázisok

I.: N6-metiladenin, II.: N4-metilcitozin, III.: C5-metilcitozin

1.2.1. A DNS metiláció jelentősége prokariótákban

Prokarióta élőlényekben mindhárom típusú metiláció (N6-metiladenin, N4-metilcitozin és C5-metilcitozin) előfordul, míg eukariótákban főként C5 típusú metiláció ismert. Prokariótákban a DNS metiláció olyan fontos folyamatokban játszik szerepet, mint a saját és idegen DNS megkülönböztetése, részt vesz a DNS replikáció során keletkezett bázispárosodási hibák javításában (posztreplikatív javítómechanizmus irányítása), valamint szabályozza a sejtciklust, azon belül a DNS replikációt.

A saját és idegen DNS megkülönböztetésében az R-M (restrikciós-modifikációs) rendszer tagjaként, mint modifikációs metiltranszferáz vesz részt (G. G. Wilson és mtsai., 1991.) mely védelmet biztosít az idegen DNS bejutással szemben. Az R-M rendszerben a modifikációs metiltranszferáz (M) párja a restrikciós endonukleáz (R).

A restrikciós-modifikációs rendszerek a metiltranszferáz és endonukleáz egymáshoz való viszonya, kofaktor igénye, a felismerőhely mérete és szimmetriája alapján négy (I.-IV.) fő csoportba oszthatók (Roberts és mtsai., 2003).

	I.típus	II.típus	III.típus	IV.típus
R és M aktivitás	Multifunkciós enzim R és M aktivitással	Külön R és M enzim	Multifunkciós enzim R és M aktivitással és külön M enzim	Egy vagy két fehérjéből állnak, csak a módosított DNS-t hasítják (nincs M)
Hasítóhely	Nem specifikus a felismerőhelytől >1 000 bp-ra	A felismerőhelyen belül vagy kívül meghatározott helyen	A felismerőhelytől specifikus távolságra	Felismerőhelytől specifikus távolságra
Ismert példa	EcoKI	EcoRI	EcoP1I	McrBC

1.táblázat: Az R-M rendszerek típusai

Az ismert R-M rendszerek túlnyomó többsége a II. típusba tartozik. A modifikációs metiltranszferáz egy adott célszekvenciát módosít (a II. típus esetén ez általában 2-8 bázispár hosszú, sokszor palindróm szekvencia), míg a restrikciós enzim párja hasítja az adott célszekvenciát, ha az nincs metilálva. Ily módon képes az R-M rendszer megvédeni a baktériumot a bakteriofágoktól, plazmidoktól. Ha egy bakteriofág mégis túléli a hasítást, DNS-e metilált lesz, képes megfertőzni a baktériumsejtet, utódai is a gazdasejtrel azonos metilációs mintázatot hordoznak, tehát ez az R-M rendszer többet nem nyújt védelmet a baktériumsejtnak. Sok baktérium azonban egynél több R-M rendszerrel rendelkezik, ez hatékonyabb védelmet nyújt a bakteriofág fertőzéssel szemben. Mai tudásunk szerint több mint 4000 különböző II. típusú restrikciós endonukleázt és több mint 1700 különböző II.

típusú modifikációs metiltranszferázt ismerünk (<http://rebase.neb.com/rebase/statlist.html>). A restriktív-modifikációs rendszerek hozzájárulhatnak a bakteriális genom diverzitásához is, a homológ rekombináció elősegítése révén. A bejutó idegen DNS-t a gazda restriktív endonukleáza feldarabolja, ezek a fragmentumok pedig szubsztrátjai a sejtben működő exonukleázoknak. Az exonukleázok működésének eredményeképpen az idegen DNS fragmentumai rekombináció révén integrálódhatnak a gazda kromoszómájába (Arber, 2000). Egy másik elképzelés szerint (Kobayashi, 2001) a restriktív-modifikációs rendszerek sokfélesége azért is alakulhatott ki, mert a rendszer „önző” genetikai elemként viselkedik, hozzájárulva a horizontális géntranszferhez. Az a baktériumsejt, mely elveszíti R-M rendszerét, az úgynevezett „post segregation killing” folyamat miatt meghal. Az endonukleáz és a metiltranszferáz kódoló gének eltűnése a sejtosztódás, vagy más néven szegregáció után az endonukleáz és metiláz fehérjék egyre kisebb koncentrációját eredményezi az utódsejtekben. A folyamat eredményeként az újonnan replikálódott baktérium kromoszómát már a kevés metiltranszferáz enzim nem képes teljes mértékben metilálni, megvédeni a sejtben maradt endonukleázoktól, végeredményben a kromoszóma áldozatul esik a restriktív endonukleázoknak, a sejt meghal. Akár egyetlen restriktív hasítás is elég a kromoszómán (hibajavítás nélkül), hogy a sejt halálához vezessen, míg a teljes védelemhez a metilázoknak az összes felismerőhelyet metilálniuk kell, és végeredményben ez a kényes egyensúlyi helyzet borul fel az R-M rendszer elvesztésekor.

A restriktív endonukleázok és a modifikációs metiltranszferázok leggyakrabban együtt fordulnak elő, léteznek azonban magányos metiltranszferázok, melyek közül egyeseknek a feladata a sejtosztódás koordinálása. Az egyik legismertebb, legjobban tanulmányozott ilyen enzim az *Escherichia coli* Dam metiláza, amely részt vesz a DNS-mismatch-repair, a kromoszómareplikáció és szegregáció, a plazmidreplikáció, a transzpozíció és a génkifejeződés szabályozásában (Messer és Noyer-Weidner, 1988). A Dam metiltranszferáz metilálja az adenin bázist a GATC szekvencián belül, a DNS mindkét szálán. A replikáció megtörténte után az eredeti szülői szál metilált, míg az újonnan szintetizálódott szál metilálatlan (hemimetilált állapot: G^mATC/GATC). Ez a hemimetilált állapot a replikáció után rövid ideig, 2-4 másodpercig áll fenn, ekkor van lehetőség a replikáció során keletkezett hibák kijavítására. A sejt hibajavító rendszere felismeri a metilálatlan (új) láncot, és az eredeti (metilált) szállal komplementerré javítja. A Dam metiláz jelentős szerepet tölt be a replikáció, és a sejtciklus összehangolásában is. Sokrétű és fontos feladatai ellenére a Dam metiltranszferáz nem esszenciális az *Escherichia coli* számára. Igaz a Dam metiltranszferázt nem tartalmazó, illetve túltermelő mutáns *E. coli* sejteknél megnövekedett spontán mutációs frekvenciát tapasztaltak (Palmer és Marinus, 1994.). A Dam metiláció ugyan nem esszenciális az α -proteobaktériumok esetén, de fontos szerepe van bizonyos baktériumok patogenezisében (Heusipp és mtsai., 2007).

A Dam metiltranszferázhoz nagyon hasonló rendszer működik a *Caulobacter crescentus*-ban. A Ccrm metiltranszferáz szintén az adenin bázist metilálja a GANTC szekvencián belül, és a sejtciklus szabályozásában van fontos szerepe (Reisenauer és mtsai., 1999). Érdekes, hogy míg a γ -proteobaktériumok szubdivíziójába tartozó *E. coli* esetén a Dam metiltranszferáz nem esszenciális, az α -proteobaktériumok esetén a Ccrm hiánya a sejt halálát eredményezi.

Az R-M rendszerek fő feladata a baktériumsejtbe került idegen (metilálatlan) DNS eliminálása. Az *E. coli* sejtek védekeznek a sejtbe bejutott metilált DNS-szel szemben is. A metilált citozint tartalmazó DNS *E. coli* sejtekbe való bejuttatását gátolják a baktériumban működő metilcitozin specifikus restrikciós rendszerek (mcr, mrr) (Raleigh és Wilson, 1986, Heitman és Model, 1987). Ezek a restrikciós rendszerek az *E. coli* sejtbe bekerülő metilált citozint tartalmazó DNS-t hasítják.

I.3. A DNS metiltranszferázok

A DNS metiltranszferázok *in vivo* szubsztrátja a DNS replikációja során keletkező hemimetilált DNS. A restrikciós-modifikációs rendszerek részeként működő DNS metiltranszferázok három, újabban négy fő típusba sorolhatók (I-IV.) (1. táblázat). A legismertebb, legjobban tanulmányozott, és leggyakrabban előforduló metiltranszferázok a II. típusba tartoznak. Jellemzőjük, hogy többnyire monomerként működő enzimek és közös sajátságuk, hogy egy kötődési eseményben általában csak a DNS egyik szálát metilezik. Mivel primer szerkezetükben belső szimmetriát felfedezni nem lehet, ezért egy kettősszálú, metilálatlan felismerőhelyhez történő kötődés során kétféle komplex kialakulása lehetséges. Az egyik komplex az egyik szál, a másik komplex a másik szál metilálásáért felelős.

A II. típusú metiltranszferázok az általuk katalizált metilációs reakció alapján három csoportba oszthatók, így megkülönböztetünk C5-citozin, N6-adenin, és N4-citozin metiltranszferázokat. Jelenleg több mint hatszáz II. típusú metiltranszferáz génjét sikerült klónozni. Az aminosavsorrendek ismeretében lehetőség nyílt a metiltranszferázok primer szerkezetének összehasonlítására. A szekvenciák hasonlóságainak és különbözőségeinek meghatározásával közelebb juthatunk a metiltranszferázok működési mechanizmusának megismeréséhez. Az eddig elvégzett szekvenciaösszehasonlítások a következő eredményeket hozták: A C5-citozin-metiltranszferázok között jelentős mértékű szekvenciahasonlóságot találunk. A C5-metilázok tíz konzervált blokkot tartalmaznak, amelyek mindig azonos sorrendben követik egymást, és minden C5-metiltranszferázban megtalálhatók (Pósfai és mtsai., 1989). Lényegesen kisebb a hasonlóság az N4-citozin és N6-adenin-metiltranszferázok csoportjában. Az N4-citozin és az N6-adenin

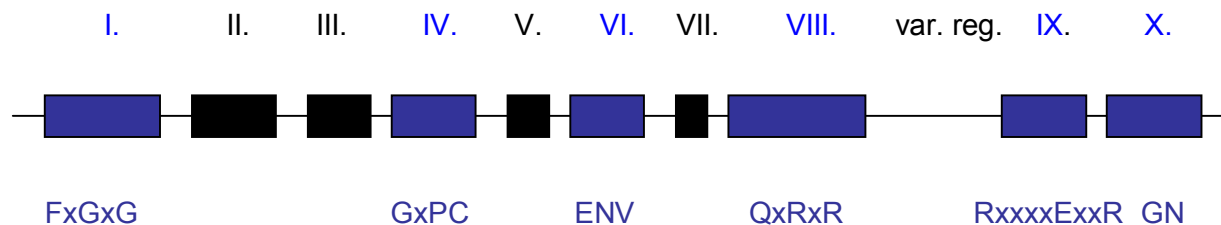
metiltranszferázok közötti szerkezetbeli hasonlóság működésbeli hasonlóságot is takar (Gong és mtsai., 1997, Jeltsch és mtsai., 1999, Jeltsch, 2001).

Az első konzervatív motívum nemcsak a II. típusú metiltranszferázoknál, hanem valamennyi olyan metiltranszferáznál megtalálható, amely metildonorként S-adenozil-metionint (SAM) használ (Lauster, 1989; Klimasauskas és mtsai., 1989). Az itt található aminosavak a metildonor kötésében játszanak szerepet (Kagan és Clarke, 1994).

1.3.1. A prokarióta C5-citozin metiltranszferázok

A C5 metiltranszferázokban tíz konzervált motívum fordul elő, amely az enzimes család majdnem minden tagjában megtalálható ugyanabban a sorrendben, beleértve az emlős metiltranszferázokat is (Pósfai és mtsai., 1989). A tíz konzervált szekvenciablokk közül hat (I., IV., VI., VIII., IX., X.) erősen, négy gyengébben konzerváltnak bizonyult.

A VIII. és a IX. motívum között található egy hosszabb szakasz, az ún. variábilis régió, melynek mérete és aminosavszekvenciája nagy változatosságot mutat az egyes enzimek esetében. A konzervált motívumok felelősek a C5-metiltranszferázokra közösen jellemző kémiai reakciókért, és a variábilis régió határozza meg a szekvenciaspecifitást (Chen és mtsai., 1991). A C5-citozin metiltranszferázok általános szerkezetét a 2. ábra mutatja.



2. ábra: A C5-citozin metiltranszferázok általános szerkezete

A téglalapok a konzervált motívumokat szimbolizálják. A leginkább konzervált szekvenciablokkok kékek, a kevésbé konzerváltak feketék. Az adott motívumra jellemző aminosavak a motívumok alatt találhatóak. Az x bármely aminosavat jelöl.

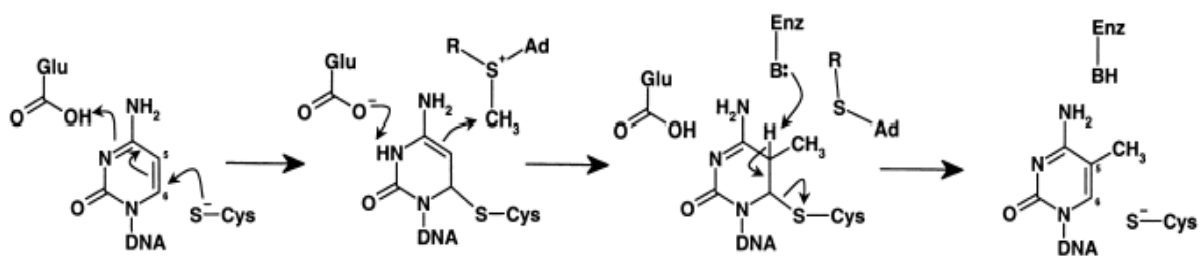
Az összehasonlító vizsgálatok megállapították, hogy a SAM-ot metildonorként használó enzimek többségében megtalálható a FXGXG szekvencia (I. motívum), ahol az X bármilyen aminosavat jelöl. A motívum a SAM kötéséért felelős, amit a HhaI, TaqI és a PvuI metiltranszferázok SAM-mal alkotott kokristályainak röntgendiffrakciós szerkezeti modelljei is alátámasztanak, ugyanis az említett motívum mindhárom esetben a metildonor-kötő zseb részének bizonyult (Cheng és mtsai., 1993; Labahn és mtsai., 1994; Gong és mtsai., 1997).

A IV. motívum tartalmaz egy konzervált prolin-cisztein dipeptidet, amely a katalitikus hely részeként biztosítja a nukleofil tiol csoportot. A cisztein mutációja a katalitikus aktivitás elvesztését okozza. A röntgendiffrakciós elemzések közvetlenül is azonosították a katalitikus cisztein és a metilálható citozin közötti kovalens kapcsolatot.

A C5-metiltransferázok nem tartalmazzák a transzkripció faktorok szerkezetéből jól ismert hagyományos DNS-kötő motívumokat. Háromdimenziós szerkezeti modelljüket a HhaI és a HaeIII metiltransferáz enzimek DNS-sel és AdoMet-nal alkotott kokristályának röntgendiffrakciós elemzése alapján állították fel (Cheng és mtsai., 1993; Reinisch és mtsai., 1995). Két doménbe rendeződnek, amelyet egy, a DNS kötésére alkalmas árok választ el egymástól. A nagy domént az I-VIII. motívumok és a X. motívum nagy része alkotja. A nagymértékben konzervált I., IV., VI. és VIII. motívumból épül fel a molekula nagy doménjének központi struktúrája. Az M.HhaI kis doménjét elsősorban a variábilis régió alkotja, egyetlen konzervált motívuma a IX. motívum (Kumar és mtsai., 1994).

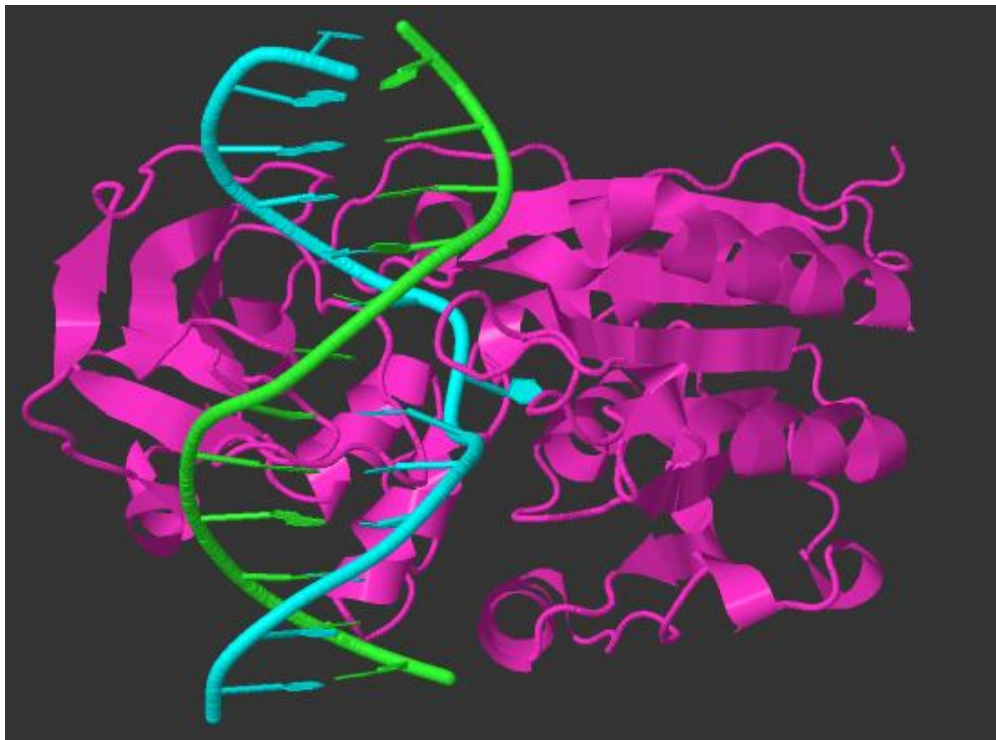
1.3.2. A C5 metiltransferázok által katalizált reakció

A C5-metiltransferázok által katalizált reakciót a 3. ábra mutatja. A C5-metiltransferázok a citozin pirimidingyűrűjében metilálják az ötös szénatomot, a reakció végterméke az 5-metilcitozin. A folyamat egyik kulcs lépése egy átmeneti kovalens komplex kialakulása az enzim és a módosítandó citozin között. A metiláz aktív helyében levő cisztein-tiol nukleofil támadást intéz a citozin hatos szénatomja ellen, amely egy kovalens enzim-DNS intermedier kialakulásához vezet. A nukleofil csoport kötődése aktiválja az ötös szénatomot, így lehetővé teszi a metilkation átadását az AdoMet-ről az ötös szénatomra és az S-adenozil-L-homocisztein (AdoHcy) felszabadulását. A metiltransferáz követően β -eliminációval megszűnik az enzim-DNS közötti kapcsolat. A reakció során kialakuló kovalens intermediert először Chen és mtsai. izolálták, első kísérleti bizonyítékát adva az addig főleg enzimkinetikai vizsgálatokon alapuló felételezett reakciómechanizmusnak (Chen és mtsai, 1991).



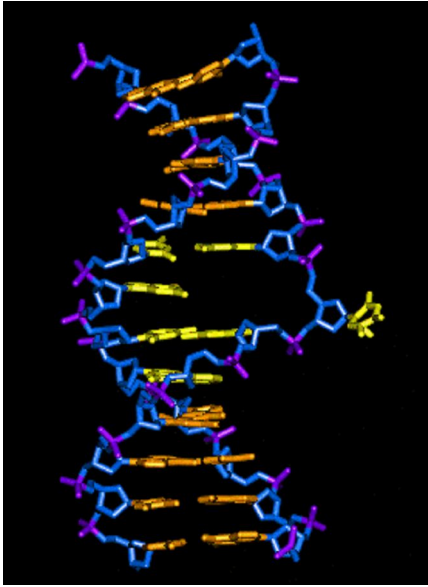
3. ábra: A C5-citozin metiltransferázok katalitikus mechanizmusa.

A HhaI metiltranszferáz a *Haemophilus haemolyticus* II. típusú restrikciós-modifikációs rendszerének tagja, 327 aminosavból épül fel. Az enzim a 5'-GCGC-3' szekvenciát ismeri fel, amelyen belül az első citozint metilálja. Ez volt az első olyan C5-metiltranszferáz, amelyből sikerült röntgendiffrakciós vizsgálatra alkalmas minőségű kristályt előállítani. A metilációs eseményt követően a DNS-AdoHcy-enzim komplex blokkolható, ha a reakcióban részt vevő oligonukleotidban a metilálandó citozin hidrogén atom helyett fluort tartalmaz az ötös szénatomon. A terner komplex röntgendiffrakciós szerkezetéből készült modellt a 4. ábra mutatja. (Klimasauskas és mtsai., 1994).



4. ábra A HhaI metiltranszferáz röntgendiffrakciós szerkezeti modellje. Lila: M.HhaI enzim, kék és zöld: DNS. (Klimasauskas és mtsai., 1994)

Igazolták, hogy a DNS kötése valóban a két domén által formált árokban történik. A kötött DNS B formában van, a bázispárokat hidrogénkötések tartják össze a Watson-Crick párosodásnak megfelelően, kivéve a metilálandó citozint tartalmazó G-C bázispárt. A metilálandó citozin a DNS kettős spirálból teljesen kifordul (base flipping) (5. ábra), így elérhetővé válik az enzimátikus módosítás számára.



5. ábra: Base flipping. A HhaI metiltranszferáz DNS és AdoMet komplex szerkezeti modelljéből a szubsztrát DNS-szakasz látható, amelyből a metiltranszferáz kifordította a metilálható citozint (Klimasauskas és mtsai., 1994)

A citozin kifordítása után a DNS szerkezete instabillá válik, amelyet az enzim két aminosava stabilizál (Gln237 és Ser87). Ezek hidrogénkötéseket létesítenek egymással és a magányos guaninnal és erősítik a bázisok közötti hidrofób kölcsönhatásokat.

Bár a röntgendiffrakciós vizsgálatokból származó eredmények a DNS C5-metiltranszferázok szerkezetének és működésének számos részletét felfedték, illetve megerősítették, mégis jónéhány kérdést megválaszolatlanul hagytak. Például nem biztos, hogy az enzim és a reakció végtermékei közötti komplex röntgendiffrakciós elemzése során megállapított DNS-fehérje kölcsönhatások megegyeznek azokkal az interakciókkal, amelyek a DNS kezdeti kötődése során megvalósuló szekvencia-specifikus felismerésért felelősek. Valószínűnek tűnik, hogy a kezdeti felismerési lépés és a citozin kifordulása a DNS kettős spirálból egymástól függő, egyidejűleg zajló reakciók. A metilált citozin bázis DNS-be történő visszaépülésének mechanizmusa szintén tisztázatlan. E kérdések megválaszolásához nagy segítséget nyújthat olyan mutáns enzimek vizsgálata, melyek a reakcióút egyes lépéseiben mutánsok, illetve olyan citozinanalógok használata, amelyek a reakcióút egyes lépéseiben gátolják a folyamatot.

1.3.3. A DNS metiltranszferázok szekvenszificitása

A C5 citozin metiltranszferázok általános szerkezetéből kézenfekvő volt az a feltételezés, hogy a katalitikus folyamatok általános lépéseikért a konzervált régiók, míg a szekvenszificitásért a variábilis régió felel. Ezt alátámasztották a multispecifikus metiltranszferázokkal végzett kísérletek. A multispecifikus metilázok bakteriofágokból

származó enzimek, jellemzőjük, hogy nemcsak egy, hanem több célszekvenciát is képesek felismerni, és metilálni. Az enzimek variábilis régiója a monospecifikus metiltranszferázokkal összehasonlítva lényegesen hosszabb, a variábilis régió belül a különböző szekvenciákat felismerő régiókat target recognition domain-eknek (TRD régió) nevezik. A különböző célszekvenciákat különböző TRD-k ismerik fel. A TRD régiók cseréje a különböző enzimek között a szekvenciaspecifitás megváltozását eredményezte, tehát ezek a kísérletek bizonyították, hogy a szekvenciaspecifitásért a multispecifikus enzimek esetén valóban a TRD régiók felelősek (Wilke és mtsai., 1988, Balganesh és mtsai., 1987).

A monospecifikus metiltranszferázok szekvenciaspecifitásáról biokémiai és szerkezeti vizsgálatok állnak rendelkezésünkre. A „footprint” egy olyan *in vitro* technika, mellyel megállapítható a DNS-kötő fehérjék szekvencia specifitása. A módszer lényege, hogy egy rövid DNS szakaszt (50-200bp) általában radioaktívan jelölnek, majd a DNS-kötő fehérjének megfelelő körülményeket teremtve megtörténik a DNS-fehérje kötődés. Ezután kémiai vagy enzimátikus (pl DNázI) hasítással a jelölt DNS darabot random, nem szekvenciaspecifikus módon hasítják, majd poliakrilamid gélen analizálva a reakciót kimutatható, mely DNS régióhoz kötődött szekvenciaspecifikusan a vizsgált DNS-kötő fehérje. A footprint technikát kombinálva kémiai ágensekkel, melyek szelektíven módosítanak bizonyos bázisokat, még több információ szerezhető a szekvenciaspecifikus DNS kötésről. A dimetilszulfát (DMS) egy metilcsoportot rak a guanin 7-es nitrogénatomjára a nagy árokban, és ugyancsak metilálja az adenin 3-as nitrogénjét a kis árokban. Így ha a jelölt DNS-t a DNS metiltranszferáz kötés után dimetilszulfáttal kezelik, megállapítható, hogy az enzim a DNS kis, vagy nagy árki felszínével létesített specifikus kapcsolatokat. Az MSssI és az MHhaI metiltranszferázok footprint analízise kimutatta, hogy ezen enzimek a nagy árki felszínnel létesítenek kapcsolatokat, a kis árki kölcsönhatások minimálisak (Renbaum és mtsai., 1995).

A C5 metiltranszferázokkal végzett röntgendiffrakciós kísérletek is alátámasztják, hogy a variábilis régió a szekvenciaspecifitást meghatározó régió. A HhaI, és a HaeIII metiltranszferázok röntgendiffrakciós szerkezete megmutatta, hogy a nagy domént alkotó konzervált szekvenciárészek a DNS kis árkával, míg a kis domén alkotásában részt vevő variábilis régió a DNS nagy árkával létesít kapcsolatot. Kimutatták, hogy a szekvenciaspecifikus DNS felismerés az enzim kis doménje, és a DNS nagy árka közötti kapcsolatokon keresztül valósul meg. (Klimasauskas és mtsai., 1994; Reinisch és mtsai., 1995).

1.3.4 A DNS metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatása

A monospecifikus metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatása intenzíven kutatott, de a sok erőfeszítés ellenére igen kevés sikeres kísérletet ismerünk az

irodalomból. A röntgendiffrakciós szerkezeti modellek alapján, a multispecifikus metiltranszferázok TRD régiói cseréjének mintájára, az MHPall és a MHhal enzimek hibridjeit (Klimasuskas és mtsai, 1991), valamint az MMspl és az MHPall hibridjeit hozták létre (Mi és Roberts, 1992). Sikeresen létrehoztak megváltozott specifitású, funkcióképes hibrid enzimeket, bár enzimek az eredeti, vad típusú enzimekhez képest jóval kisebb aktivitással rendelkeztek. Ezen kísérletek igazolták a variábilis régió szekvenciaspecifitást meghatározó voltát ezeknél az enzimeknél.

Munkacsoportunk régóta foglalkozik a *Salmonella infantis*-ből származó M.SinI metiltranszferázzal. Az enzim 461 aminosavból áll, molekulatömege 51.8 kDa, az enzim háromdimenziós szerkezete még nem ismert. A SinI metiltranszferáz a GGA/TCC szekvenciák mellett kismértékben ugyan, de képes felismerni és metilálni a GGG/CCC szekvenciákat is (Karreman és de Waard, 1988).

A Hhal és HaeIII metiltranszferázok háromdimenziós szerkezete ismert, röntgendiffrakciós adatokkal bizonyították, hogy a szekvenciaspecifikus DNS felismerés az enzim kis doménje és a DNS nagy árka között történik. Kutatócsoportunkban végzett korábbi kísérletek azonban azt az eredményt hozták, hogy az M.SinI (GGA/TCC) és az M.EcoRII (CCA/TGG) enzimek esetén (háromdimenziós szerkezetük nem ismert) a szekvenciaspecifikus DNS felismerés egy eleme, a felismerőszekvencián belüli A/T, illetve G/C elkülönítés, a DNS kis árkával létesített kapcsolatokon keresztül valósul meg (Kiss és mtsai., 2001).

A DNS kis árkával a nagy domén létesít kapcsolatot, ezen enzimek esetén így a szekvenciaspecifitást nem kizárólag a variábilis régió határozza meg. A feltételezést alátámasztja, hogy a munka során az M.SinI enzim génjét erős mutagenézisnek és szelekciónak vetették alá, és megváltozott specifitású mutánsokat izoláltak. Olyan relexált specifitással rendelkező mutánsokat kerestek, melyek nemcsak a GGA/TCC, hanem a GGG/CCC helyeket is képesek metilálni. Az izolált mutánsok esetén a megváltozott specifitást okozó mutációk a nagy doménben, az V. konzervált blokkban találhatóak. A kísérletek során a SinI metiltranszferáz génjének igen nagy részét mutagenizálták, mely magában foglalta a variábilis régiót is.

A sikeres kísérlet indított el arra minket, hogy a teljes SinI gént mutagenizáljuk, relexált fenotípusú mutánsokat izoláljunk, és a megváltozott specifitásért felelős aminosavak elemzése révén több információt szerezzünk a szekvenciaspecifitást meghatározó tényezőkről.

I.4. Mutagenézis, *in vitro* evolúciós kísérletek

A vegyipar, a gyógyszeripar, a kozmetikai ipar és természetesen a molekuláris biológia is igényt tart új enzimekre, melyek hőstabilabbak, új aktivitásokkal rendelkeznek, szűkebb, vagy tágabb specifikációs spektrumuk van, vagy egyéb előnyös tulajdonsággal rendelkeznek, mint a jelenleg rendelkezésre állók. A természetben ismert enzimek módosításával, mutagenézisével új tulajdonságú enzimeket nyerhetünk, melyek nemcsak ipari felhasználásban alkalmazhatók, de a mutáns enzimek vizsgálata közelebb vihet az enzimkinetikai reakciók, a hőstabilitás, vagy éppen a szekvensspecifikitás jobb megértéséhez.

A mutagenézissel történő fehérje módosítási technikák két nagy csoportot alkotnak, aszerint hogy a fehérjét egy meghatározott részen, előre megtervezett aminosav vagy akár nagyobb fehérjerégió cseréjével, vagy – az evolúciós változásokhoz hasonlóan – véletlenszerűen generált mutációkkal kívánjuk módosítani. Az előbbi esetben irányított, míg az utóbbiban véletlenszerű (random) mutagenézisről beszélünk. A mutagenézis után megfelelő szelekciós technikát választva halásszuk ki a kívánt tulajdonságú enzimet a mutáns populációból, illetve egyéb tesztrendszert (screen) használunk.

A fehérjét kódoló gén mutagenézisét a random mutagenézis során többféleképpen végezhetjük. Alkalmazhatunk mutátor törzset, PCR technikát, kazetta mutagenézist (összefoglaló a témából: Kuchner és Arnold, 1997). Az egyik legkorábbi sikeres alkalmazás során error-prone PCR segítségével mutagenizálták a szubtilizin E proteázt, és olyan mutánsokat kerestek, melyek szerves oldószerben, dimetilformamidban aktívak. Olyan mutáns enzimet sikerült így előállítani, mely 60%-os dimetilformamidban majdnem olyan hatékonyan működött, mind a vad típusú enzim vízben, közel 500-szorosára növelve a K_{cat}/K_m értéket (You és Arnold, 1996). A kazetta mutagenézis során az enzim egy meghatározott régióját (a fehérje térszerkezetének ismeretében) mutagenizálják random oligonukleotidok segítségével, majd a kívánt tulajdonságra szelektálnak, illetve a megváltozott tulajdonságra tesztelnek. Egy ilyen kísérlet során a herpes simplex vírus 1 (HSV-1) timidin kináz enzimjét változtatták meg, a ganciklovirral szemben 43-szoros, az aciklovirral (antivirális szerek, nukleozid analógok) szemben pedig 20-szoros érzékenységet mutatott a vad típusú enzimmel összehasonlítva (Black és mtsai, 1996). Mutátor törzs alkalmazására szép példa a kanamicin nukleotidiltranszferáz enzim hőstabilitásának növelése. (A mutátor törzsekről általánosságban elmondható, hogy mutáns DNS polimeráz III enzimmel rendelkeznek, és sokszor a replikáció utáni DNS hibajavítás is sérült. Így tehát az ilyen mutátor törzsekbe transzformált plazmidok a DNS replikációk során egyre több és több mutációt hordoznak.) A mezofil *Bacillus subtilis* vad típusú kanamicin nukleotidiltranszferáz enzimje a termofil *Bacillus stearothermophilus*-ban 47°C

hőmérsékleten aktív, míg 55°C-on, és felette nem. A mutátor törzs segítségével előállított mutáns enzim pedig 63°C hőmérsékleten is aktivitást mutatott (Liao és mtsai, 1985).

Kísérleteink során PCR alapú mutagenézist alkalmaztunk, kombinálva véletlenszerű DNS keveréssel (DNA-shuffling). A random mutagenézis után a mutációk véletlenszerű kombinálását érhetjük el a DNS keverés (Stemmer, 1994) technika alkalmazásával. A mutagenizált géneket magnézium, vagy mangán ionok jelenlétében DNázI enzimmel emésztjük, majd a kisméretű (10-300bp) DNS darabok véletlenszerű rekombinációját hajtjuk végre. (A DNS keverés technikát részletesebben az Anyagok és Módszerek fejezetben ismertetem.) A DNS keverés technika sikeresen alkalmazható géncsaládok között is, melyek akár különböző fajokból származnak (family-shuffling). Egy ilyen kísérlet során négy különböző baktériumból származó cefalosporináz gén DNS keverését végezték el, és egy új, moxolaktám antibiotikumot nagy hatásfokkal degradáló kimérát kaptak (Cramer és mtsai, 1998). A DNS keverés technikát napjainkban előszeretettel alkalmazzák *in vitro* fehérjeevolúciós kísérletekben. A fehérjék megváltoztatása evolúciós módszerekkel intenzíven kutatott téma, irodalma is nagyon széles. A technika alkalmazásával nagyon sok fehérje hőstabilitását, szekvenciaspecifitását, enantioszelektivitását stb. sikerült megváltoztatni (összefoglaló publikációk: Antikainen és Martin, 2005, Tao és Cornish, 2002).

Az irányított evolúciós technikák az utóbbi évtizedben robbanásszerű fejlődésen mentek keresztül. A DNS polimerázok irányított evolúciója mind a kutatás, mind pedig a biotechnológiai alkalmazások forró pontja. A PCR technikák fejlődése (reverz PCR, multiplex PCR, szekvenálási technikák, stb) olyan új tulajdonságú polimerázokat igényel, melyek a négy természetes dezoxi-nukleozid trifoszfáton (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) kívül egyéb nukleozid analógokat is képesek a DNS láncba építeni. Szükség van olyan polimerázokra is, melyek összetett mintákat (pl: vér, föld, bűncselekmények nyomai, fossziliák, stb) templátként használva jó minőségű, analizálható DNS-t eredményeznek. (összefoglaló publikáció: Laos és mtsai, 2014) Wang és munkatársai (Wang és mtsai 2004) megnövekedett processzivitással rendelkező Taq és Pfu polimeráz enzimeket fejlesztettek, fúzionáltatva a polimeráz enzimeket egy Sso7 nevű fehérjével, mely a *Sulfolobus solfataricus* hipertemofil archeából származó kettős szálú DNS-t kötő fehérje. A fúziós polimerázok az eredeti enzimekhez képest hatékonyabb enzimeknek bizonyultak PCR reakcióban a vad típusú polimerázokhoz képest. A fúziós Pfu polimeráz ugyanolyan PCR körülmények között 15 kilobázis DNS amplifikálására volt képes, míg a vad típusú enzim maximálisan 5 kilobázis DNS-t eredményezett. d'Abbadie és munkatársai három *Thermophilus* faj, a *Thermus thermophilus*, a *Thermus aquaticus* és a *Thermus flavus* DNS polimeráz I enzim génjein csinált DNS keverést. A létrejött kiméra enzim képes volt károsodott DNS amplifikálására, 50.000 éves barlangi medve mitokondriális DNS darabjait amplifikálták ilyen módon. Az ősi DNS minták sok egyszeres, kétszeres, vagy akár

többszörös hibás bázispárosodásokat, hiányzó bázisokat tartalmazhatnak, melyeket a Taq polimeráz nem képes átírni, a kiméra enzim azonban alkalmas lehet károsodott DNS minták amplifikálására, szekvenálására is (d'Abbadie és mtsai, 2007). Rengeteg példát lehetne még írni, laboratóriumban evolválta bakteriális és eukarióta enzimekről, újabb és újabb ötletes technikákról. Végezetül csak annyit, hogy az *in vitro* fehérjeevolúció mellett az *in vivo* fehérjeevolúciós technikák is óriásit fejlődtek. Egy nagyon fontos *in vivo* alkalmazás a MAGE (multiplex automated genomic engineering), mellyel sejten belül egyszerre több gént, DNS régiót lehet változtatni tervezett oligonukleotidok segítségével (Wang és mtsai, 2009). Egy másik fontos alkalmazás a genom DNS keverése (genome shuffling). A módszer alkalmas mind prokarióta mind eukarióta sejtek genomjának keverésére, mutáns sejtpopulációból kiindulva az eredeti genomok véletlenszerű, random keverését érhetjük el, új tulajdonságú sejteket létrehozva. Egy igen szemléletes példa a genom DNS keverés alkalmazására a *Streptomyces fradiae* tilozin termelésének növelése (a tilozin egy komplex poliketid típusú antibiotikum). A vad típusú *Streptomyces fradiae* SF1 nevű törzse 1g/l tilozint termel. 20 év kutatómunkájával, nitrites sav, ultrabolya besugárzás, és nitrozo-guanodin, mint hagyományos mutagén ágensek alkalmazásával az 1g/l-ről 6g/l-re sikerült ezt feltornászni. A hagyományos mutagenézis során az eredeti vad típusú baktériumot mutagenizálták, a mutánsok tilozin termelő képességét mérték, kiválasztották a legjobb termelőt, majd ezt újra mutagenizálták, ismét a legjobb termelőt kiválasztották, és így ment ez éveken keresztül. A genom DNS keverés alkalmazásával ugyanilyen jól termelő, azaz az eredeti szülői baktériumnál háromszor jobb termelőt egy év alatt sikerült produkálni, a hagyományos 20 évvel szemben. Az eredeti baktériumot nitrozo-guanidin kezelésnek vetették alá, majd a jobban termelőket kiválasztották, számszerint 11-et, protoplasztot készítettek belőlük, majd genomi DNS keverést hajtottak végre több cikluson keresztül (Zhang és mtsai, 2002).

II. Célkitűzés

Kísérleteink célja megváltozott szekvenciaspecifitással rendelkező SinI metiltranszferáz mutánsok előállítása volt. Célunk azoknak az aminosavaknak az azonosítása volt, amelyek feladata az enzim DNS felismerőhelyén belüli A/T illetve G/C bázisok elkülönítése. A csoport már korábban (Kiss és mtsai, 2001) izolált ilyen mutánsokat, akkor azonban csak a nagy domént kódoló régiót mutagenizálták. Jelenleg bemutatott munkám során a teljes SinI metiltranszferáz gént mutagenizáltam, majd a random mutagenizált gének fragmentumainak újrendezését végeztem a DNS keverés technika segítségével, végül erős szelekciót alkalmazva izoláltam egy megváltozott specifitású, mutáns SinI metiltranszferázt.

A dolgozat másik részében a régebben (Kiss és mtsai, 2001) és a jelenlegi kísérletek során izolált megváltozott szekvenciaspecifitású mutáns SinI metiltranszferázok *in vivo* vizsgálatát végeztük. A kísérletek során azt kívántuk tesztelni, vajon a megváltozott specifitású enzimek képesek-e, illetve milyen mértékben képesek védelmet nyújtani a baktériumsejteknek egy GGNCC specifitású endonukleázzal szemben.

III. Anyagok és Módszerek

Alkalmazott baktériumtörzsek

Munkánk során az alábbi *Escherichia coli* baktériumtörzseket használtuk. Az XL1-Blue MRF' (Stratagene) törzset használtuk a mutagenézis és a DNS keverés után a PCR termékek klónozásához, a mutánsok szelekciójához. A törzs genotípusa: $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac$ [F' *proAB lacI^qZ* Δ M15 Tn5 (Kan^r)]. Az ER1398 *F endA1 thi1 hsdR2 supE44 mcr1* λ^- (Raleigh és Wilson, 1986.) baktériumtörzset a pER23S(-ATG) vektorba klónozott metiltranszferázok túltermelésére alkalmaztuk. Ugyanezt a törzset használtuk a DNS ligáz *in vivo* hatását vizsgáló kísérletekben. Az N2604 *lig ts7* (Gottesman és mtsai., 1973.) törzset a DNS ligáz gént hordozó rekombináns plazmid ellenőrzésére használtuk. A DH10B *F⁻ endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL Δ lacX74 Φ 80lacZ Δ M15 araD139 Δ (ara, leu)7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ^-* baktériumtörzset az életképességet vizsgáló kísérleteknél alkalmaztuk.

A baktériumokat Lysogeny Broth (LB) tápoldatban illetve táplemezen növesztettük, általában 37°C-on. A metiltranszferázok túltermelését 30°C-on végeztük, az enzimtermelést 1 mM izopropil- β -D-galaktopiranozid (IPTG) hozzáadásával indukáltuk. A hőérzékeny replikációval rendelkező plazmidokat 30°C-on tartottuk fenn, 42°C-on elimináltuk. Az antibiotikumokat a következő koncentrációkban használtuk: ampicillin (Ap) 100 μ g/ml, kanamicin (Kan) 50 μ g/ml, kloramfenikol (Cm) 25 μ g/ml, gentamicin (Gm) 10 μ g/ml, eritromicin (Em) 15 μ g/ml. A táplemezek készítéséhez 1.5% agart használtunk.

Plazmidok

Az in vitro mutagenézis és szelekció során használt plazmidok

A pTZ57R/T klónozó vektort (Fermentas) használtuk a mutagenézis és DNS keverés után keletkezett PCR termékek klónozásához. A pER23S(-ATG) (Lukacsovics és mtsai., 1990.) túltermelő plazmidba klónoztuk a mutáns metiltranszferáz géneket. A pVH1 (Haring és mtsai., 1985.) *lacI_q* represszor gént tartalmazó plazmidot alkalmaztuk a pER23S(-ATG) plazmidról induló transzkripció represszálására. A mutagenézis során templátként a pSin5 (Kiss és mtsai., 2001) plazmidot használtuk, mely a SinI modifikációs metiltranszferáz génjét tartalmazza.

Az életképességi kísérletekben használt plazmidok

A 4. táblázat tartalmazza a plazmidok eredetét, antibiotikum rezisztenciájukat, és a plazmidok által kódolt, a kísérlet szempontjából fontos fehérjét. Az eredmények részben az adott kísérletben szereplő plazmidok sematikus ábrája a fontosabb restrikciós helyekkel szintén megtalálható. A dolgozatban leírt munka során készített plazmidok létrehozását az Eredmények fejezetben írom le. A pSI4 (Karremann és de Waard, 1988.) a teljes SinI restrikciós-modifikációs rendszert tartalmazza, pUC19 vektorban. A pSin5 (Kiss és mtsai., 2001) ennek egy HindIII-deléciós származéka, eltávolítva a *sinIR* gén 3' végét, a *sinIM* gént hordozza. A pSin10-19 és a pSin10-106 (Kiss és mtsai., 2001), a pSin5-höz hasonlóak, annak mutáns származékai. A pSin10-19 az N172S, a pSin10-106 a V173L aminosavcserét hordozó mutáns metiltranszferáz géneket tartalmazza. A pSau1 (Szilák és mtsai., 1990.) és ennek deléciós származéka a pSau2 a Sau96I metiltranszferáz génjét hordozzák (pBR322 alapúak, Ap^R). A pSau21 plazmid a teljes Sau96I restrikciós-modifikációs rendszert tartalmazza, pOK12 (Vieira és Messing, 1991) alapú (Kan^R). A pSTC-MSau96I (Cm^R) a Sau96I metiltranszferáz gént kódolja, pSC101^{ts} alapú, (Pósfai és mtsai., 1997) hőérzékeny replikációjú plazmid, mely 30°C-on fenntartható, 42°C-on eliminálódik a sejtéből. A pMSin-RSau a pSI4 származéka, hibrid restrikciós-modifikációs rendszert hordoz, a SinI metiltranszferáz gént és a Sau96I endonukleáz gént. A pLG2520 plazmid (Ishino és mtsai., 1986) az *E.coli* DNS ligáz génjét tartalmazza. A pJAT13*araE* (Khlebnikov és mtsai., 2001) az arabinóz transzporter gént kódolja, konstitutív promóter irányítása alatt. A plazmid pBBR1 replikációs origót tartalmaz, eritromicin, és gentamicin rezisztenciát kódol. A pUC19-alapú konstrukciók ColE1 replikációs origót, a pOK12 alapúak p15A replikációs origót tartalmaznak, a pBBR1 origó ezekkel kompatibilis.

Plazmid DNS tisztítás

Plazmid DNS-t 1,5 ml kultúrából alkalikus feltárással (Sambrook és mtsai., 1989) tisztítottunk. A plazmid DNS mintákat TE pufferben (10 mM Tris-HCl (pH, 7,4), 1 mM EDTA) oldottuk fel, -20°C-on tároltuk. Nagyobb mennyiségű DNS preparátumot, vagy a szekvenciameghatározáshoz szükséges tisztaságú mintát a Viogene, a V-gene, vagy a Qiagen cégek által forgalmazott plazmid DNS tisztító kitékkel nyertünk.

A kísérletek során alkalmazott vegyszerek, enzimek

A DNS fragmentumok klónozásához szükséges restrikciós enzimeket a Fermentas és a New England Biolabs cégektől szereztük be. A T4 DNS ligáz, a Taq DNS polimeráz, és a Pfu DNS polimeráz a Fermentas-tól származik, a DNázl a Promega cég terméke, a [metil-³H]AdoMet (111 GBq/mmol) a New England Nuclear-tól származik. A gyártók által javasolt pufferekben és körülmények között végeztük a reakciókat. A kísérletekhez a Sigma, és a Reanal cégek által forgalmazott analitikai tisztaságú vegyszereket használtuk.

Agaróz gélelektroforézis

A DNS-minták gélelektroforézise 1-1.5 %-os agaróz gélben történt. A kisméretű, 10-200 bázispáros fragmentumokat a Sigma cég által forgalmazott VII. A típusú, alacsony dermedéspontú 2%-os agarózgélben futattuk. Az elektroforézishez 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.3, 50 mM bórsav tartalmú puffert (TEB) használtunk. A DNS-t a gélben 0.5 µg/ml etídium-bromiddal festettük, 254 nm hullámhosszúságú ultraibolya fénnel tettük láthatóvá.

Fehérjék gélelektroforézise denaturáló körülmények között

A fehérjék SDS-PAGE gélelektroforézisét Laemmli módszerével (Laemmli, 1970) végeztük. A fehérjemintákat 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% Na-dodecil-szulfát (SDS), 10% glicerin, 5% β-merkaptoetanol és kis mennyiségű brómfenolkék tartalmú pufferben 10%-os poliakrilamid géltre vittük, és 25 mM Tris-HCl-t (pH 8.0), 0.2 M glicint, 0.1% SDS-t tartalmazó pufferben elektroforetizáltuk. A gélt Coomassie Brilliant Blue-val (R250) festettük.

DNS fragmentum izolálása agaróz gélből

A DNS fragmentumok agaróz gélből történő izolálását a Qiagen cég által forgalmazott QIAquick Gel Extraction Kit segítségével végeztük. A forgalomban levő fragmentizáló kitékkel a 40-70 bázispárnál kisebb fragmentumokat egyáltalán nem, vagy csak kis hatékonysággal lehet izolálni. Ezért a DNS keverés során keletkező kisméretű, 10-200 bázispáros fragmentumok izolálását DE81 (Whatmann) papírral végeztük. A 2%-os, alacsony dermedéspontú agaróz géltre felvitt mintákat elektroforetizáltuk, steril pengével vágást ejtettünk az izolálandó régió alatt és fölött, ebbe a kis vágásokba helyeztük a DE81 papírcsíkokat, majd a gélt visszahelyeztük a futtató tankba, tovább futattuk. A DNS fragmentumok kötődtek a papírcsíkokhoz, a másik papírcsík pedig megakadályozta, hogy az izolálandó fragmentumoknál nagyobb méretű DNS molekulák is a papírhoz kötődjenek. A

DE81 papírcsíkról 1 M NaCl-lel eluáltuk a DNS-t, majd fenol-kloroformos extrakcióval tisztítottuk, és etanollal kicsaptuk. A kicsapott DNS-t TE pufferben oldottuk.

Plazmid DNS bejuttatása Escherichia coli sejtekbe

A baktériumok transzformálását a Lederberg és Cohen által kidolgozott CaCl_2 -os módszerrel (Lederberg és Cohen, 1974) végeztük. A CaCl_2 -dal kompetenssé tett sejteket a plazmid DNS-sel egy órán keresztül jégen inkubáltuk, majd 2 percre 42°C -ra tettük. A hőkezelés után a sejtekhez 1 ml LB táptalajt adtunk és egy órán keresztül 37°C -on rázattuk. Ezután 100 μl baktériumkultúrát szélesztettünk megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezre, és egy éjszakán át termosztátban inkubáltuk 30 , 37 , illetve 42°C -on.

Elektroporáció során az elektrokompetens sejtek készítését és a baktériumok elektroporációját a Hengen által javasolt módszerrel (Hengen, 1995) végeztük. Az elektrokompetens sejtekhez maximum 3 μl DNS-t adtunk, és a keveréket a Bio-Rad cég által gyártott 0.1 cm elektródatávolságú Gene Pulser küvettába pipettáztuk. A transzformálást a Bio-Rad cég MicroPulser elektroporátorával végeztük, 1500 V feszültségen. Ezután a sejteket LB tápoldatban 37°C -on növesztettük 1 órán át. 100 μl baktériumkultúrát szelektív agarlemezre szélesztettünk, és egy éjszakán át inkubáltuk termosztátban 30 , 37 illetve 42°C -on.

A SinI metiltranszferáz gén mutagenézise

A mutagenézist PCR technika alkalmazásával végeztük. Az „error-prone” PCR során (Spee és mtsai., 1993) három dezoxi-nukleotid trifoszfátból (dNTP) azonos mennyiséget, egyből pedig kevesebbet adtunk a reakcióelegybe. A reakcióba dITP-t is (dezoxi-inozin trifoszfát) adtunk. Mivel a dITP bármely másik, a DNS-ben természetesen előforduló nukleotiddal képes bázispárosodást létesíteni, növeli a hibás párosodások számát. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 10 ng templát DNS (pSin5), 20-20 pmol SinA, és SinB oligonukleotidok (lásd alább), 2mM MgCl_2 , PCR puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40), 0.2 mM három dNTP-ből, 0.014 mM az egyik dNTP-ből, 0.2 mM dITP, egy egység Taq DNS polimeráz. Az alkalmazott program: 94°C 3 perc/ 94°C 30 s, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc, 25 ciklusban/ 72°C 5 perc.

A „hipermutagén” PCR során (Buchholz és mtsai., 1998) az egyik dNTP-t jóval nagyobb mennyiségben alkalmaztunk, valamint MnCl_2 -t is tettünk a reakcióelegybe. A reakcióban jelen levő mangán ionok növelik annak a valószínűségét, hogy a Taq polimeráz hibás nukleotidokat építsen be. A reakcióelegy összetétele: 10 ng templát DNS (pSin5), 20-20

pmol SinA, és SinB oligonukleotidok, 9 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40, 0.2 mM három dNTP-ből, 3.4 mM 1 dNTP-ből, egy egység Taq DNS polimeráz.

Egy másik reakcióelegyben 0.04 mM dATP és dGTP mellett 0.2 mM dCTP-t és dTTP-t használtunk, 4 mM MgCl₂, és 0.25 mM MnCl₂ jelenléte mellett. Az alkalmazott program ugyanaz volt, mint az előző reakciók során.

A SinA primer: 5' ACC GGA TCC TTC AGT TTA GA

BamHI

A SinB primer: 5' GCA GAA TTC GCG ACA ATA CG

EcoRI

A PCR reakciók eredményeként egy kb 1.7 kilobázisos DNS fragmentumot kaptunk. Mivel a PCR reakciókban jelen levő eredeti templát DNS, és a primerek zavarják a shufflingot, részt vehetnek a rekombinációs folyamatban, a mutagenizált géneket minden esetben agaróz gélből izoláltuk a DNS shuffling reakció előtt.

A DNS keverés

Két különböző DNS keverés módszert használtunk. A mutagenizált M.SinI gént vagy MgCl₂ (Stemmer, 1994), vagy MnCl₂ (Zhao és Arnold, 1997) jelenlétében emésztettük DNázl enzimmal.

Emésztés DNázl-geyel MnCl₂ jelenlétében

A reakcióelegy komponensei 50 µl végtérfogatban: 2-4 µg PCR-rel mutagenizált fragmentum, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MnCl₂ és 0.4 egység DNázl (Promega). A reakcióhoz használt PCR program: 23°C 2 perc/ 90°C 10 perc (utóbbi a DNázl inaktiválásához szükséges). A kisméretű (10-200) bázispáros fragmentumokat fenol-kloroformos extrakcióval tisztítottuk, etanollal kicsaptuk, majd vízben oldottuk.

Emésztés DNázl-geyel MgCl₂ jelenlétében

A reakcióelegy összetevői 100 µl végtérfogatban: 2-4 µg PCR-rel mutagenizált fragmentum, 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 6 mM MgCl₂, 10 mM NaCl, 10 mM CaCl₂ és 0.3 egység DNázl (Promega). A reakciót szobahőmérsékleten végeztük, 5, 10, 15, 20 és 25 perc elteltével mintákat vettünk, melyeket 2%-os alacsony dermedéspontú agaróz gélen, futattunk,

meghatároztuk a megfelelő inkubálási időt. A kb. 10-100 bp nagyságú DNS-fragmentumokat 2%-os alacsony olvadáspontú agaróz gélből izoláltuk.

Polimeráz láncreakció:

Primer nélküli PCR a DNázl emésztéssel kapott M.SinI génfragmentumok közötti rekombináció létrehozására

A reakció során az M.SinI génből származó, különböző hosszúságú DNS-fragmentumok között rekombináció játszódik le, amely az egyes fragmentumokban levő mutációk kombinálásával új tulajdonságú fehérjét kódoló DNS-szakasz létrejöttét eredményezheti. A reakció összetétele: 10-30 ng/μl 10-200 bp fragmentum, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP és 1 egység Taq DNS-polimeráz. A MnCl₂-os emésztést követő primer nélküli PCR program: 94°C 3 perc/ 94°C 1 perc, 55°C 1 perc, 72°C 30 s + 5 s ciklusonként, 40 ciklusban/ 72°C 5 perc.

A MgCl₂-os emésztést követő primer nélküli PCR program: 94°C 1 perc/ 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 40 ciklusban/ 72°C 5 perc.

Polimeráz láncreakció az eredeti méretű M.SinI gén visszanyerésére

Templátként a primer nélküli PCR reakció 1/10-1/40 arányú hígítását használtuk. A további összetevők: 20 pmol AK54 primer, 20 pmol AK55 primer, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP és 1 egység Taq DNS-polimeráz. Az AK54 és AK55 belső primerek, az 1.4 kb-os M.SinI gént amplifikálását teszik lehetővé, a translációs iniciációs ponttól a stop kodonig. Az alkalmazott program a következő volt: 94°C 3 perc/ 94°C 30 s, 55°C 1 perc, 72°C 1 perc, 25 ciklusban/ 72°C 5 perc.

Az AK54 primer: 5' CCGCTCGAGATGATAATGAATGAATGACATCAA TAC

Az AK55 primer: 5' CCGCTCGAGTTAGACCAACTCTCCAAA

Mindkét primerbe XhoI hasítóhelyet terveztünk, (aláhúzva), melyet a fragmentum klónozásánál kívántunk felhasználni.

Egyéb polimeráz láncreakciók

A vad típusú M.SinI gén amplifikálására pSin5 templátot, AK54 és AK55 primereket használtunk, a reakciót nem mutagén körülmények között végeztük. A PCR terméket a Taq

polimeráz által a DNS fragmentum 3' épített dA nukleotidot kihasználva pTZ57R/T vektorba klónoztuk, az így kapott plazmid neve pTZS.

A Sau96I endonukleáz gén amplifikálását pSau21 templáton, AK143 és AK144 primerekkel végeztük (lásd alább). A reakció összetétele: 10 ng templát, 10-10 pmol primer, 2mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40, 0.2mM dNTP, 1 egység Pfu polimeráz. Az alkalmazott program a következő volt: 94°C, 3 perc/ 94°C 30 s, 50° 45 s, 72°C 1 perc 25 ciklusban/ 72°C 5 perc. Az amplifikált kb. 750 bp-os fragmentumot először pTZ57R/T vektorba ligáltuk, az így kapott plazmidot pTZSau-nak neveztük el. A pTZSau plazmidot NcoI és XbaI enzimekkel emésztettük majd az NcoI és XbaI enzimekkel emésztett pOK-BAD plazmidba klónoztuk. A kapott konstrukció neve pOB-R.Sau96I.

AK143 : 5' GCCATGGCTAATAAGTATTTAAGTTTTATC

AK144 : 5' GTTTAGTGTCTATTATTCTAACAT

A mutagenézis és DNS keverés után nyert PCR termékek direkt klónozása

A PCR termékeket agaróz gélből tisztítottuk, majd 0.1-0.3 µg pTZ57R/T (Fermentas Inst/A Clone™ PCR Product Cloning Kit) plazmidhoz ligáltuk. A reakciót 16°C-on végeztük, 12-14 órát inkubáltuk. A ligátumot tisztítottuk, majd elektrokompetens sejtbe transzformáltuk.

A mutagenizált gének szelekciója

A mutagenézis és DNS keverés után nyert transzformánsokat LB médiumban öszemostuk a lemezekről, majd 100 µl-t kivéve 10 ml LB/Amp folyadékban növesztettünk OD₅₅₀=0.4-0.5-ig 37°C-on. (A pTZ57R vektorban IPTG-vel indukálható promoter van, a klónozás során ezen indukálható promoter mögé ültettük a mutáns SinI géneket). 1 mM IPTG-t adtunk a baktériumkultúrához, és további 4 órát növesztettük 30°C-on. Az indukált kultúrából plazmidot izoláltunk, 500 ng DNS-t emésztettünk 15 egység Cfr13I endonukleázzal. A Cfr13I nem hasítja a GGNCC helyeket, ha a belső citozin metilált (Bitinaite és mtsai., 1985) Az emésztésből különböző időkből mintákat vettünk, *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, meghatároztuk a transzformálás utáni telepszámot. Kontrollként az indukált pTZS (vad típusú M.SinI) plazmidot használtuk.

A mutáns metiltranszferáz fehérjék tisztítása

A mutáns M.SinI enzimeket a vad típusú enzimhez kidolgozott módszer (Kiss és mtsai., 2001) kissé módosított változatával tisztítottuk. A pER23S(-ATG) túltermelő vektorba klónozott génről IPTG hozzáadásával indukáltuk a metiltranszferáz termelődését. Mivel a transzkripció szintje indukátlan állapotban is magas, represszálására a pVH1 plazmidot, mely a *lacI_q* represszor génjét tartalmazza, alkalmaztuk. A sejteket 37°C-on növesztettük OD₅₅₀=0.5-ig, majd 1 mM IPTG hozzáadása után 30°C-on, 4 órán keresztül végeztük az indukciót. A sejteket centrifugáltuk, 20 mM Tris-HCl (pH=8.0), 1 mM EDTA, 7 mM β-merkaptotanol tartalmú pufferben szuszpendáltuk, majd ultrahangos kezeléssel feltártuk. A homogenizátumot centrifugáltuk, (4°C, 15.000 rpm, 30 perc), majd a felülúszót PC pufferrel (20 mM kálium-foszfát (pH=7.5), 10 mM β-merkaptotanol, 1 mM EDTA, 5% glicerin) ekvibrált foszocellulóz oszlopra vittük. A fehérjéket 0.2-1 M NaCl (PC pufferben) grádienssel eluáltuk. A frakciókat védési teszttel vizsgáltuk (ld. következő módszer). Az aktív frakciókat (0.46 és 0.5 M NaCl között) összegyűjtöttük, 0.2 M NaCl tartalmú PC pufferrel szemben dializáltuk. A fehérjéket 0.2 M NaCl tartalmú PC pufferrel ekvibrált heparin-agaróz oszlopra vittük, ugyanolyan NaCl gradienssel végeztük az elúciót, mint az első oszlop esetén. Az aktív frakciókat, melyek 0.5 és 0.57 M NaCl koncentráció között jöttek le az oszlopról, összegyűjtöttük, dializáltuk töményítő pufferrel (0.1 M Tris-HCl (pH=7.5), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% glicerin) szemben, a mintát -20°C-on tároltuk. A tisztított enzim mennyiségét Bradford-reakcióval, (Bradford, 1976) 595 nm hullámhosszon mért optikai denzitása alapján határoztuk meg.

A metiltranszferázok aktivitásának mérése

A metiltranszferázok aktivitásmérését a csoport által már közölt (Kiss és mtsai., 2001) módon végeztük. A mérésekhez metildonorként tríciummal jelölt [metil-³H]-AdoMet metildonort (SAM), és két 19 bp-os duplaszálú oligonukleotidot használtunk. A két oligonukleotid szekvenciája:

AK13-14 : 5'-GACGTCAGG**ACC**ACTCCTC
 CTGCAGT**CCTGGT**GAGGAG-5'

AK15-16 : 5'-GACGTCAC**CGGG**ACTCCTC
 CTGCAGT**GGCCCT**GAGGAG-5'

A mutáns M.SinI enzim egyensúlyi kinetikai paramétereit, a két szubsztrát (DNS és SAM) egyikének telítési koncentrációja mellett a másik koncentrációjának változtatásával végeztük. A reakcióelegyek metiláz puffert (50 mM Tris-HCl pH=8.5, 50 mM NaCl, 1 mM ditiotreitolt), 7,

13, 27, 67, 133, 267, 667, 1333, vagy 2667 nM) mennyiségű oligonukleotidokat, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, vagy 5 μ M mennyiségű [metil- 3 H]-AdoMet (111 GBq/mmol), New England Nuclear) és 7 nM tisztított enzimet (M.SinI L214S+Y229H) tartalmaztak. 20 perces 30°C-os inkubációt követően az enzimet 4 μ l 10 %-os SDS-sel inaktiváltuk, majd a reakcióelegyet DE81 papírkorongra pipettáztuk. A korongokat háromszor 50 mM Na₂HPO₄-el, ezt követően kétszer 95 %-os etanollal mostuk, majd megszárítottuk. A papírkorongokat szcintillációs küvettába helyeztük, majd 10 ml toluolos koktélt mértünk a küvettába. A toluolos koktél készítésekor 1000ml toluolhoz adtunk 4 g 2,5 difenil oxazolt, és 0.05g 1,4 bis 5-fenil 2-oxazol benzént. A beépült 3 H aktivitást az SZBK Biokémiai Intézetében a Perkin Elmer cég által forgalmazott Tri-Carb folyadékszcintillációs készülékkel mértük.

A SinI metiltranszferáz preparátumok félkvantitatív mérésére úgynevezett védési tesztet használtunk. Az oszlopról eluált frakciókból vett mintákat inkubáltuk 500 ng pBR322 plazmid DNS (15 GGNC helyet tartalmaz), 2.5 μ M Ado-Met, 50 mM Tris-HCl (pH=8.0), 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, és 1 mM DTT jelenlétében, 25 μ l végtérfogatban, 20 percig 37°C-on, majd hőkezeléssel inaktiváltuk a metiltranszferázokat (65°C-on, 20 percig). Ezután 4 μ l 100 mM MgCl₂-t, és 1 egység Cfr13I enzimet adtunk a reakciókhoz, 37°C-on 1 órán keresztül inkubáltuk, majd 1%-os agaróz gélen analizáltuk a mintákat.

DNS szekvenciameghatározás

A mutáns M.SinI gén nukleotidszekvenciájának meghatározása az SZBK Automata Szekvenáló Laboratóriumában történt. A reakcióban használt primerek a következők voltak:

DS5 primer 5' AACATGGCCCTTATCGGAGA

AK42 primer: 5' TGATATCCAAGGCGACATTC

XS5 primer: 5' AATTCGGCGGTCCTCAA

MS3 primer: 5' TCTGGGAATAGCACATG

AK54 primer: 5' CCGCTCGAGATGATAATGAATGAATGACATCAATAC

AK55 primer: 5' CCGCTCGAGTTAGACCAACTCTCCAAA

A DS5, az XS5, és az AK54 primerekkel a *sinIM* gént kódoló szál, a többi primerrel a komplementer szál szekvenciáját határoztattuk meg. Az AK54 az M.SinI gén 5' elejéhez, a DS5 a gén első negyedéhez, míg az XS5 a gén feléhez hibridizál. Az AK55 a gén 3' végéhez, az AK42 a gén első harmadához, az MS3 pedig a gén második harmadához hibridizál.

A baktériumsejtek GGSCC specifikus endonukleázzal szemben mutatott életképességének vizsgálata

Kísérletünkben azt vizsgáltuk, vajon azok a mutáns SinI metiltranszferázok, melyek jelentősen megnövekedett aktivitást mutatnak a GGSCC szubsztráthelyen, képesek-e *in vivo* igazi GGSCC specifikus modifikációs DNS metiltranszferázként viselkedni. (Az eredmények részben található 4 táblázat tartalmazza a kísérletek során használt plazmidokat, antibiotikum rezisztenciájukat, eredetüket). A baktériumsejtekben a szabályozható expressziójú endonukleáz gént tartalmazó plazmidot (pOB-R.Sau96I, Kan^R) Sau96I metiltranszferáz gént kódoló plazmid mellett tartottuk fenn (pSTC-M.Sau96I, Cm^R). A pOB-R.Sau96I plazmidban az arabinóz operon szabályozza a Sau96I endonukleáz gén transzkripcióját, arabinózzal indukálható, míg glükózzal gátolható a transzkripció. A Sau96I metiltranszferázt kódoló plazmid HpaI enzimmel emészthető, az endonukleáz gént tartalmazó plazmidban nincs HpaI hely. Az arabinóz transzporter gént, (pJAT13araE (Gm^R)), valamint a vad és mutáns metiltranszferáz géneket (pSin5, pSin10-19, pSin10-106, illetve pSin10-5mut) kódoló plazmidokat tartalmazó DH10B sejteket HpaI-gyel emésztett pOB-R.Sau96I/pSTC-M.Sau96I preparátummal transzformáltuk. A transzformánsokat LB/Ap/Kan/Gm/és 0.2% glükóz tartalmú lemezekre szélesztettünk, majd a lemezeket 42°C-on inkubáltuk 16 órán át. A telepeket ugyanilyen antibiotikum tartalmú lemezekre (37°C inkubáció), valamint LB/Cm lemezekre tovább passzáltuk. Az LB/Cm lemezeket 30°C-on inkubáltuk, ellenőrizve a transzformánsok kloramfenikol szenzitivitását (Cm^S), vagyis a Sau96I metiltranszferáz gént hordozó plazmid eliminálását. A Gm^R, Ap^R, Kan^R, Cm^S baktériumsejtek szuszpenzióját 17% glicerinnel kiegészítve -80°C-on tároltuk.

A kísérletek során alkalmazott optimális arabinózkoncentráció megállapításához a -80°C-on tárolt tenyészetekből indított, egy éjszakán át LB/Gm/Ap/Kan/glükóz médiumban növesztett sűrű tenyészeteket friss táptalajjal 20-szorosára hígítottuk, OD₅₅₀=0.6-0.7-ig növesztettük 37°C-on. 5-5 µl baktériumkultúrát 100µl LB-be tettünk, majd 10-es léptékű hígítási sort készítettünk. A mintákból 5-5 µl-t pipettáztunk olyan lemezekre, melyek gentamicin, ampicillin és kanamicin mellett 0.2% glükózt, illetve különböző koncentrációjú L-arabinózt tartalmaztak. A lemezeket 37°C-on inkubáltuk.

A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek telepformáló képességét vizsgáló kísérletekben a következőképpen jártunk el. LB/Gm/Ap/Kan/glükóz médiumban növesztett sűrű tenyészeteket friss táptalajjal 20-szorosára hígítottuk, OD₅₅₀=0.3-0.6-ig növesztettük 37°C-on. A kultúrákat LB médiumban azonos optikai denzitására hígítottuk, majd 10-es léptékű hígítási sort készítettünk. A tenyészetekben levő élő sejtszám meghatározásához az azonos optikai denzitású mintákból 100-100 µl-eket szélesztettünk

LB/Gm/Ap/Kan/glükóz, illetve 0.01% arabinózt tartalmazó lemezekre. A lemezeket 37°C-on inkubáltuk.

A Sau96I endonukleáz aktivitásának mérése nyers sejt kivonatból

A pSau2, pOB-R.Sau96I és pJAT13araE plazmidokat tartalmazó DH10B baktériumsejteket 50 ml LB/Gm/Ap/Kan/glükóz médiumban növesztettük OD₅₅₀=0.4-ig 37°C-on. A tenyészetet centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és ugyanilyen térfogatú LB/Gm/Ap/Kan és 0.005% arabinózt tartalmazó médiumban növesztettük tovább, 37°C-on, 3 órán át. A sejteket ismét centrifugáltuk, 3 ml feltárápufferben (50 mM Tris HCl (pH=8.0), 10 mM β-merkaptóetanol, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk, ultrahanggal feltártuk. Újabb centrifugálás után a felülúszót a feltárápufferrel hígítottuk 10, 100, és 1000-szeres léptékben. A mintákat 0.6 µg lambda fág DNS-sel inkubáltuk, 50 mM K-acetát, 20 mM Tris-acetát, 10 mM Mg-acetát, és 1 mM DTT jelenlétében 37°C-on, 1 órán át. A reakciókat agaróz gélen teszteltük.

Ugyanilyen módon mértük a Sau96I endonukleáz aktivitását azokban a kísérletekben, amelyekben a megnövelt DNS ligáz szint életképességet növelő hatását vizsgáltuk. A 10 ml LB/Ap/Kan médiumban éjszakán át sűrűre nőtt pMSin(V173L)-R.Sau, pOK-LigA plazmidokat tartalmazó ER1398 sejteket 1 ml feltárápufferben vettük fel, és meghatároztuk a sejt kivonatban lévő Sau96I endonukleáz aktivitást.

IV. Eredmények

IV.1. A vad típusú *M.SinI* gén mutagenézise, a mutáns gének fragmentumainak újrendezése (DNS keverés)

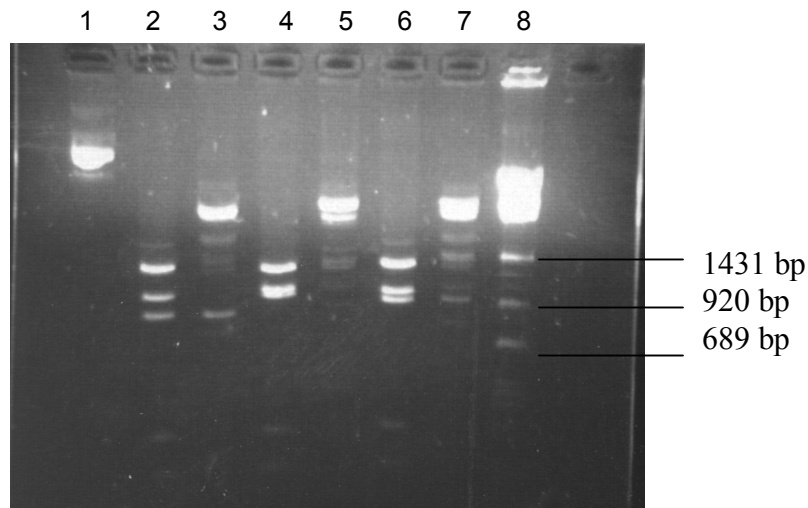
A vad típusú *M.SinI* gént kétféle módon, az un. „error-prone” és a „hipermutagén” PCR technikákat alkalmazva mutagenizáltuk. A mutagenizált DNS fragmentumokat egyesítettük, ennek egyik részét $MgCl_2$, másik részét $MnCl_2$ jelenlétében emésztettük DNázI enzimmal. A mutagenézis során a SinA, és a SinB primereket használtuk, ezek felhasználásával egy kb 1.7 kb-os DNS fragmentumot kaptunk, mely tartalmazta a SinI metiltranszferáz gént, a promoter régiót, valamint a génen kívül egy hosszú 5' és 3' régiót. A DNS keverés során a primer nélküli PCR reakciók után a végső amplifikálásra AK54 és AK55 oligonukleotidokat használtunk, egy kb 1.4 kb-os végterméket kaptunk, mely a SinI metiltranszferáz gént kódolja a transzlációs iniciációs kodontól a terminációs kodonig.

IV.1.2. A mutáns *M.SinI* gén izolálása

A vad típusú *M.SinI* gént az előzőekben leírt kétféle módon mutagenizáltuk, majd DNS keverésnek vetettük alá. A magnézium, és mangán ionok jelenlétében végzett DNS keveréssel kapott termékeket egyesítettük, majd a pTZ57R/T vektorba ligáltuk. Körülbelül 7000 transzformánst kaptunk. A telepeket összemostuk, a ~7000 transzformánst tartalmazó szuszpenzióval friss tenyészetet indítottunk, melyet IPTG-vel indukáltunk (a vektorba beépített gének saját promoterüket nem tartalmazták, ezért volt szükség indukcióra), plazmid DNS-t izoláltunk, és kb 5-szörös feleslegesen levő (500ng plazmid DNS-hez 5 unit enzimet adtunk) Cfr13I (GGNCC specifitás) enzimmal emésztettük. Az emésztésből különböző időpontokban mintákat vettünk, és kis mennyiségeket *E. coli* X11-Blue sejtekbe transzformáltunk. A pTZ57R/T vektor 2 GGWCC (W=A/T) és 6 GGSCC (S=G/C) helyet tartalmaz, az *M.SinI* gén pedig 3 GGSCC helyet. A szelekció alapja, hogy amennyiben a mutáns metiltranszferáz képes metilálni a plazmidon lévő GGWCC és GGSCC helyeket is Cfr13I restriktív enzimmal szemben védve lesz. A vad típusú SinI metiltranszferáz kódoló plazmidon pedig csak a GGWCC helyek lesznek metilálva, és ezáltal a plazmid érzékeny lesz Cfr13I emésztéssel szemben. A 90 perces Cfr13I emésztés után kapott DNS preparátumot *E. coli* sejtekbe juttatva egyetlen klónt kaptunk.

IV.2. A mutáns *M.SinI* gén jellemzése

Az izolált plazmid (pTZSmut) nagyfokú rezisztenciát mutatott Cfr13I emésztéssel szemben (6. ábra). A pTZS (vad típusú *M.SinI*) és pTZSmut plazmidokat Cfr13I, valamint SacI, EcoRI, és XbaI enzimekkel emésztettük. A SacI és EcoRI a vektor multiklónozó részén hasít, a XbaI a multiklónozó régióban és az *M.SinI* génben található.



6. ábra: A vad és mutáns *M.SinI* géneket hordozó plazmidok Cfr13I+XbaI, illetve Cfr13I+EcoRI, és Cfr13I+SacI emésztése

Az emésztéseket 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk. A minták sorrendje: 1. emésztetlen pTZS, 2-3: Cfr13I-XbaI, 4-5: Cfr13I-EcoRI, 6-7: Cfr13I-SacI emésztések. 2, 4, 6: pTZS plazmid emésztések, 3, 5, 7: pTZSmut plazmid emésztések. 8. molekulásúly marker (λ fág DNS SspI enzimmel emésztve)

A mutáns gén orientációja a várakozásnak megfelelően, a pTZ57R/T lac promoterről induló transzkripció irányával azonos volt. A vad és mutáns géneket tartalmazó plazmidokat MspI (CCGG), HhaI (GCGC), Sau3AI (GATC) és BspRI (GGCC) enzimekkel emésztettük. Ezek az enzimek érzékenyek a C5-citozin metilációra. Az MspI, HhaI, és Sau3AI emésztések azonos képet adtak, a vad és mutáns géneket kódoló plazmidok emésztési képe megegyezett. A BspRI emésztések különböztek, a metilált GGGC (a metilált citozin aláhúzással jelölve) helyek a plazmidon egyben metilált BspRI (GGC) helyek is, tehát a BspRI enzim ezeket a helyeket nem emészt. Ez a kísérlet arra utal, hogy valóban egy a GGSCC helyeket is metiláló mutáns metiltranszferázt izoláltunk, nem pedig egy aspecifikus C5-metiltranszferázt.

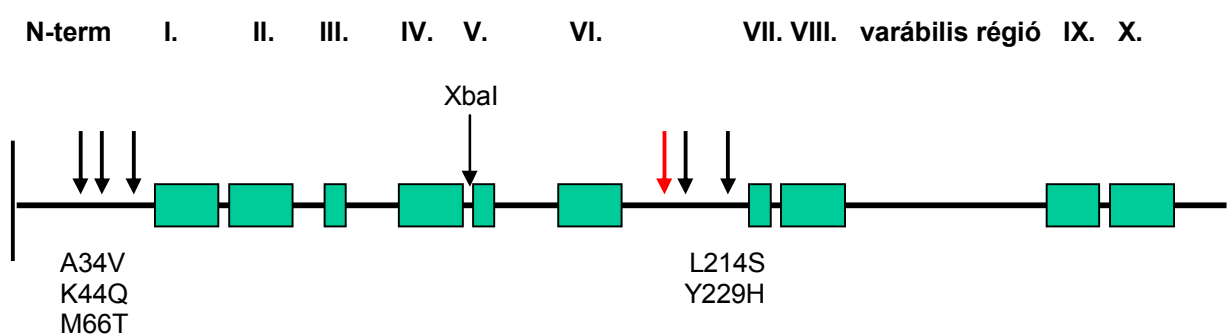
Nyers sejtkivonatot készítettünk a vad és mutáns klónokból, [metil-³H]AdoMet metildonor, és GGWCC, illetve GGSCC szekvenciát tartalmazó szintetikus oligonukleotid szubsztátokon mértük az enzimek metilációs aktivitását (2. táblázat).

	pTZS (vad M.SinI)	pTZSmut
GWCC 15 perc	1496 cpm	1202 cpm
GWCC 30 perc	2037 cpm	2729 cpm
GWCC 45 perc	2259 cpm	3762 cpm
GGSCC 15 perc	208 cpm	1139 cpm
GGSCC 30 perc	271 cpm	1499 cpm
GGSCC 45 perc	275 cpm	1976 cpm

2.táblázat: Nyers sejtkivonatok GWCC és GGSCC aktivitása az idő függvényében

A mutáns metiltranszferáz lényegesen nagyobb beütésszámokat mutatott GGSCC oligonukleotid szubsztráttal mérve, és eredeti GWCC aktivitása is megmaradt.

Meghatároztuk a mutáns gén szekvenciáját, egyetlen mutációt sem detektáltunk a variábilis régióban, amely a korábbi felfogás szerint a szekvenciaspecifitás egyedüli meghatározója. Kilenc nukleotidcserét találtunk, ebből hét tranzíció (purin bázis purinra, illetve pirimidin pirimidinre változik), kettő transzverzió (purin bázis pirimidinre, illetve pirimidin purinra változik) volt. Négy ezek közül csendes mutáció volt, azaz nem eredményezett aminosavcserét (T96C, C169T, C242T, és G618C). Öt pontmutáció (C101T, A130C, T197C, T641C és T685C) aminosavcseréhez vezetett. Az aminosavcserék a következők: a 34-es alanin valinra, a 44-es lizin glutaminra, a 66-os metionin treoninra, a 214-es leucin szerinre, a 229-es tirozin hisztidinre változott. A 7. ábra az aminosavcseréket okozó mutációk helyét mutatja.

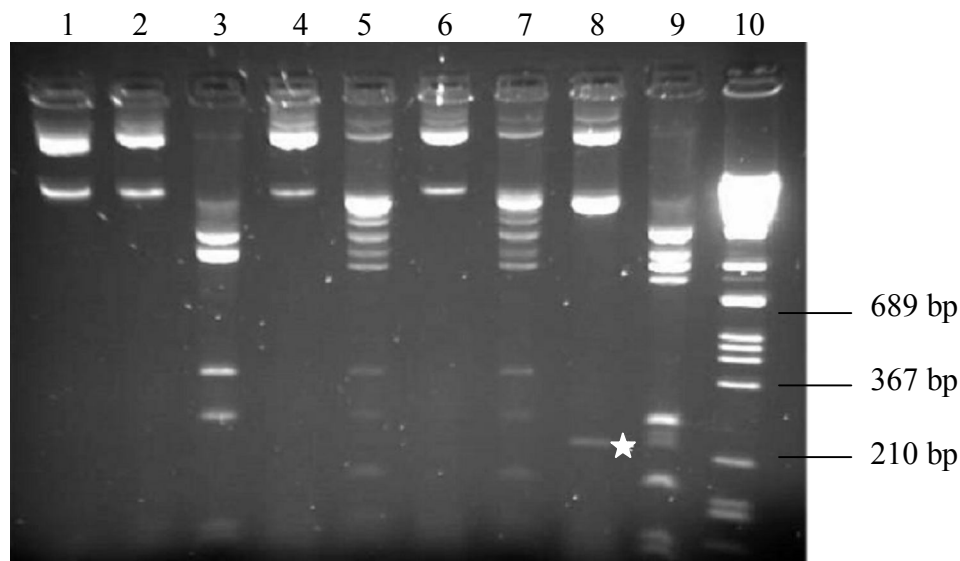


7. ábra: A mutáns M.SinI aminosavcseréi

A zöld téglalapok a konzervált régiókat, a fekete nyilak az aminosavcserék helyét jelentik. A piros nyíllal jelzett mutáció ugyan aminosavcserét nem eredményezett (G618C) de ezáltal egy új GGCCC hely jött létre. Az M.SinI génben az V. konzervált régió előtt található egy XbaI restrikciós hely, a mutációk szétválasztásánál ezt használtuk.

IV.2.1. A belső és az N-terminális mutációk szétválasztása

Az öt aminosavcseréből három a fehérje I. konzervált régióját megelőző N-terminális részben, kettő pedig a VI. és VII. konzervált régió között található. Az eredmény abból a szempontból meglepő, hogy ez az N-terminális régió sok C5-metiltranszferáz esetén hiányzik, vagy lényegesen rövidebb, a VI. és VII. konzervált régiókat összekötő szekvencia pedig a SinI metiltranszferáz esetén szintén extra hosszúságú (Kumar és mtsai., 1993.). Kíváncsiak voltunk, vajon melyik mutáció okozza a szekvenspecifitásban észlelt változást, ezért az N terminális és a belső mutációk csoportjait szétválasztottuk. A pTZ57R multiklónozó helyén található egy XbaI restriktós felismerőhely (az M.SinI gén 3' irányában), és a SinI metiltranszferáz gén is tartalmaz egyet az V. konzervált régió előtt (7.ábra). A pTZS és pTZSmut plazmidok között kicseréltük a 898 bp-os XbaI fragmentumot. Így két plazmidot kaptunk, melyek az első három, ill. az utolsó két mutációt hordozták: pTZSmut123 (A34V+K44Q+M66T) és pTZSmut45 (L214S+Y229H). A plazmidokat Eco47I (GGWCC), és Cfr13I (GGNCC) enzimekkel emésztettük (8.ábra).



8.ábra: A vad típusú és mutáns metiltranszferáz géneket hordozó plazmidok GGWCC és GGSCC helyeinek metiláltsága

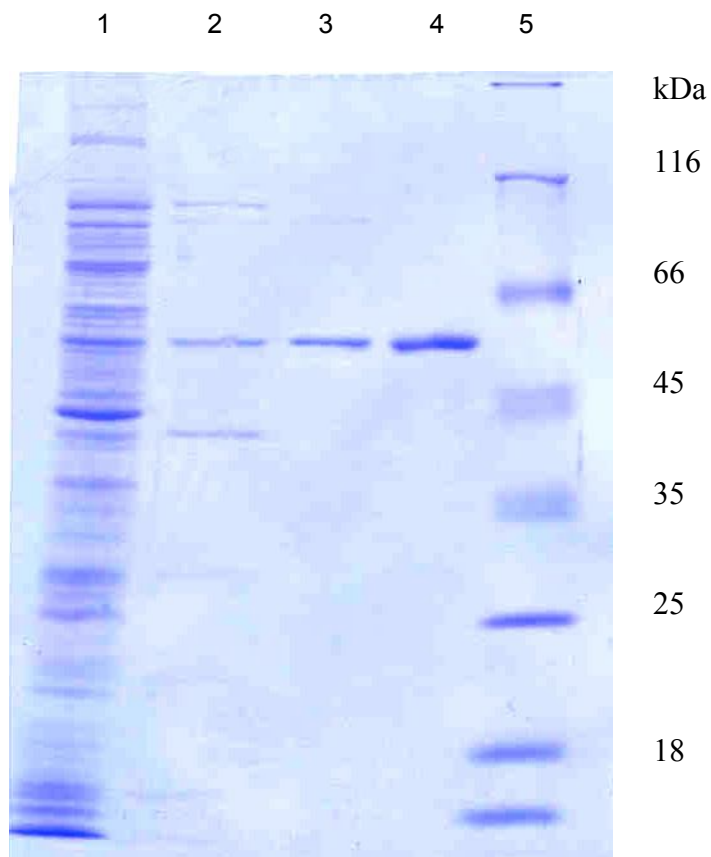
A plazmidok metiláltsági állapotát Eco47I (GGWCC) és Cfr13I (GGNCC) enzimekkel emésztve vizsgáltuk, a mintákat 1.5%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk. A minták sorrendje a következő: 1. pTZS emésztetlen, 2. pTZS-Eco47I, 3. pTZS-Cfr13I, 4. pTZSmut-Eco47I, 5. pTZSmut-Cfr13I, 6. pTZSmut45-Eco47I, 7. pTZSmut45-Cfr13I, 8. pTZSmut123-Eco47I, 9. pTZSmut123-Cfr13I, 10. molekulásúly marker (λ fág DNS SspI enzimmel emésztve) Mindegyik plazmid 2 GGWCC helyet tartalmaz, a pTZSmut123 plazmid szenzitív Eco47I emésztésre, a létrejött 222bp-os fragmentumot fehér csillag jelöli. A pTZS és pTZSmut123 kilenc GGSCC helyet tartalmaz (hat a vektorból, három a SinI metiltranszferáz génből származik), a pTZSmut, és pTZSmut45 plazmidok pedig egyel több, tíz GGSCC helyet tartalmaznak a G618C nukleotidcsere miatt.

A pTZSmut és pTZSmut45 plazmidok metiláltsági állapota gyakorlatilag azonos volt. A pTZSmut123 plazmidban a GGSCC helyek részlegesen metiláltak, a GWCC helyek metiláltsága pedig nem teljes. Ebből a kísérletből arra következtettünk, hogy a mutáns enzim megváltozott szekvenciaspecifitásának okozója főként az L214S+Y229H kettős aminosavcsere, a három, N-terminális régióban elhelyezkedő aminosavcsere hozzájárulása a megváltozott fenotípushoz minimális.

IV.2.2. A *Leu214Ser*, *Tyr229His* aminosavcseréket hordozó mutáns enzim tisztítása, jellemzése

A pTZSmut, a pTZSmut45, és a pTZmut123 plazmidokat tartalmazó baktériumsejtekből nyers sejtkivonatokat készítettünk, és radioaktívan jelölt metildonor és DNS szubsztrát jelenlétében mértük metiltranszferáz aktivitásukat. A metiltranszferáz aktivitás szintje mindhárom esetben alacsony volt. Ezért a mutáns géneket átültettük a pER23S(-ATG) (Ap^R) expressziós vektorba. A DNS keverés során használt AK54 és AK55 oligonukleotidok XhoI hasítóhelyet tartalmaznak, az XhoI végekkel rendelkező fragmentumokat a pER23S(-ATG) vektor multiklónozó helyén található Sall helyre ültettük. (A Sall és XhoI végek komplementerek). A pER23S(-ATG) vektorba épített génekről a transzkripció IPTG-vel indukálható az *E. coli* rrnB P2 promoteréről. Ebben a vektorban a promoter mögé épített génekről induló transzkripció szintje nagyon magas. A pVH1 (Kan^R) plazmidot használtuk a transzkripció represszálására.

A három N-terminális aminosavcserét, és az öt aminosavcserét hordozó klónnál ez az átültetés nem hozott sikert, a mutáns fehérjék nagy része oldhatatlan csapadék formájában volt jelen. A csak két belső (L214S+Y229H) mutációt hordozó enzim oldható formában volt, foszfozellulóz, és heparin agaróz oszlopokon tisztítottuk közel homogenitásig az Anyagok és Módszerekben leírt módszer szerint. A mutáns enzim tisztítását, és steady-state kinetikai paramétereinek meghatározását Groma Gergely végezte. A fehérjetisztítás egyes lépéseiben kapott enzimpreparátumok tisztaságát SDS gélelektroforézissal vizsgáltuk (9.ábra).

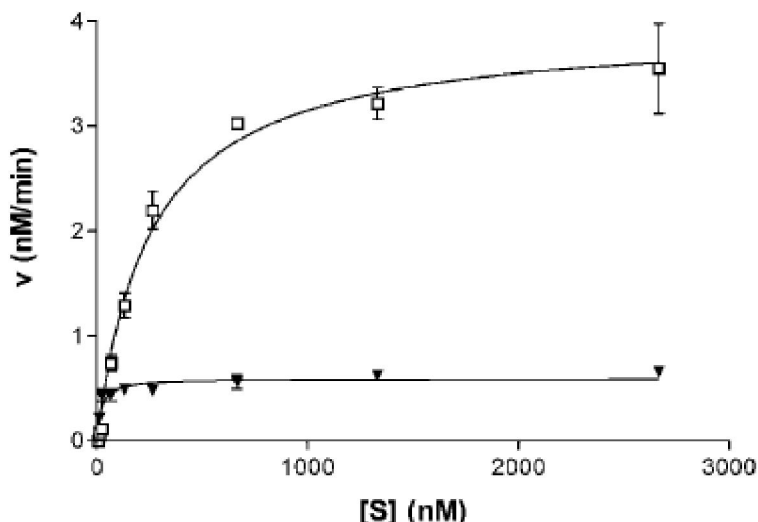


9. ábra: A Leu214Ser+Tyr229H mutációkat tartalmazó SinI metiltranszferáz enzim tisztítása

1. Ultrahangos feltárás és centrifugálás utáni sejtörmelék-mentes felülúszó, 2. foszfo cellulóz oszlopkromatográfia után 3. foszfo cellulóz és heparin-agaróz oszlopkromatográfia után, 4. vad típusú M.SinI fehérje, 5. fehérje molekulásúlymarker

A mintákat 10%-os SDS poliakrilamid gélen elektroforetizáltuk.

A tisztított mutáns enzim steady-state kinetikai paramétereit az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon határoztuk meg. A GGWCC, és a GGSCC DNS szubsztrátokra vonatkozó K_m és V_{max} értékeket, majd az enzim koncentráció ismeretében a k_{cat} és k_{cat}/K_m értékeket az 10. ábra és 3. táblázat mutatja.



10. ábra: Az L214S+Y229H mutáns enzim steady-state kinetikai analízise különböző DNS szubsztrátokkal. Az ábra a reakciósebesség alakulását mutatja a szubsztrátkoncentráció függvényében. A háromszögek a GGWCC, a négyzetek a GGSCC szubsztrátot jelölik.

3. táblázat: A vad és a mutáns (L214S+Y229H) M.SinI steady-state kinetikai paraméterei

enzimkinetikai jellemzők	M.SinI		M.SinI (L214S+Y229H)	
	GGWCC	GGSCC	GGWCC	GGSCC
K_m (nM)	17	116	20.7 ± 0.34	255 ± 15
k_{cat} (1/perc)	0.3	0.014	0.08 ± 0.0048	0.56 ± 0.06
K_{cat}/K_m ($10^5 M^{-1} s^{-1}$)	2.94	0.02	0.65	0.37

A mutáns enzim (L214S+Y229H) GGWCC szubsztráttal mutatott k_{cat}/K_m értéke 4.5-szeresére csökkent a vad típusú enzimhez képest. Ez a változás főként a GGWCC szubsztráttal mutatott csökkent k_{cat} értéknek köszönhető (a mutáns enzim K_m értéke erre a szubsztrátra a vad típusúéval közel azonos). A mutáns enzim kétszer nagyobb K_m értéket mutatott GGSCC szubsztrátra, mint a vad típusú enzim, de ez a hiány kompenzálódott a k_{cat} érték 40-szeres növekedésével. A mutáns enzim katalitikus aktivitása (k_{cat}/K_m) kb 4.5-szer volt alacsonyabb az eredeti GGWCC szubsztráttal, és kb 20-szor magasabb a GGSCC szubsztráttal, mint a vad típusú enzim ugyanezen értékei.

IV.3. A vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek GGWCC és GGNCC specifitású endonukleázzal szembeni rezisztenciájának vizsgálata

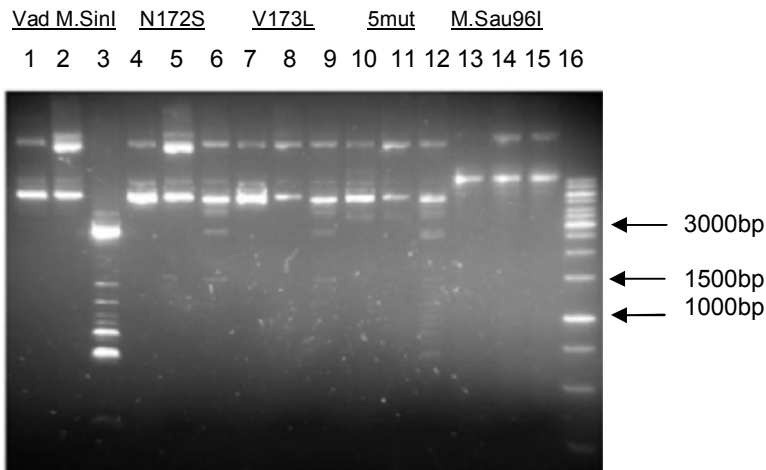
Az 4.táblázat tartalmazza a munka során használt legfontosabb plazmidokat, eredetüket, rezisztenciájukat, valamint az általuk hordozott, a kísérletek szempontjából fontos fehérjéket.

Plazmid neve	Vector/rezisztencia	A kódolt fontos fehérje	Hivatkozás
pSI4	pUC19/Ap	M.SinI + R.SinI	Karreman és de Waard, 1988
pSI4-106	pUC19/Ap	M.SinI ^{V173L} + R.SinI	a munka során készült
pSin5	pUC19/Ap	M.SinI	Kiss és mtsai, 2001
pSin10-19	pUC19/Ap	M.SinI ^{N172S}	Kiss és mtsai, 2001
pSin10-106	pUC19/Ap	M.SinI ^{V173L}	Kiss, és mtsai, 2001
pSin10-5mut	pUC19/Ap	M.SinI ^{A34V+K44Q+M66T+L214S+Y229H}	A munka során készült
pSau1	pBR322/Ap	M.Sau96I	Szilák és mtsai, 1990
pSau2	pBR322/Ap	M.Sau96I	Kiss Antaltól származik
pSau21	pOK12/Kn	M.Sau96I + R.Sau96I	Kiss Antaltól származik
pOB-RSau96I	pOK12/Kn	R.Sau96I	A munka során készült
pSTC-MSau96I	pSC101 ^{ts} /Cm	M.Sau96I	Pósfai Györgytől származik
pMSin-RSau	pUC19/Ap	M.SinI + R.Sau96I	Kiss Antaltól származik
pMSin(V173L)-RSau	pUC19/Ap	M.SinI ^{V173L} + R.Sau96I	A munka során készült
pOK-ligA	pOK12/Kn	<i>E. coli</i> DNS ligáz	A munka során készült
pJAT13araE	pJN105/Gm, Em	arabinóz transzporter	Khlebnikov és mtsai, 2001

4. táblázat: A kísérletek során használt plazmidok. A pOB-RSau96I plazmidban az R.Sau96I endonukleáz expressziója a P_{BAD} promotor által szabályozott. A pUC19 és pBR322 alapú konstrukciók ColE1, a pOK12 alapúak p15A, a pJN105 pedig pBBR1 replikációs origót hordoz.

IV.3.1.A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó plazmidok metiláltsági állapota

A pTZSmut (A34V+K44Q+M66T+L214S+Y229H) plazmidot BseRI-NdeI enzimekkel emésztettük, a keletkezett 1245 bp-os fragmentumot átültettük a pSin5 (vad M.SinI-et kódol) BseRI-NdeI helyére. Az így kapott plazmidot pSin10-5mut-nak neveztük el. A pSin5 plazmidon a SinI metiltranszferáz termelődését saját promotere irányítja. A már korábban izolált N172S és V173L metiltranszferáz mutánsok génjét szintén a pSin5 plazmidba ültették (Kiss és mtsai, 2001). A pSin10-5mut így a pSin5 (vad típusú M.SinI), pSin10-19 (N172S aminosavcsere) és a pSin10-106 (V173L) plazmidokkal identikus. A 12. ábrán, a pSin5 plazmid sematikus rajzán feltüntettük a klónozáshoz használt restrikciós helyeket. A vad és a mutáns M.SinI géneket hordozó plazmidokat (pSin5, pSin10-19, pSin10-106, és pSin10-5mut) valamint az M.Sau96I gént hordozó pSau2 plazmidot metiláció érzékeny restrikciós endonukleázokkal emésztettük. (11. ábra). Az Eco47I endonukleáz a GGWCC helyeket emészt, míg a Cfr13I a GGSCC helyeket is, ha azok a belső citozinnál nincsenek metilálva. A GGWCC helyek tökéletesen védettnek bizonyultak, míg a GGSCC helyek védettsége részleges volt, jelezve azt, hogy metiláltságuk nem volt teljes. A pSin10-19, és a pSin10-106 plazmidok rezisztensebbek voltak Cfr13I emésztéssel szemben, mint a pSin10-5mut, tehát az N172S, illetve V173L mutációkat tartalmazó mutánsok jobban metilálják a GGSCC helyeket, mint az 5 aminosavcsere (A34V, K44Q, M66T, L214S, Y229H) tartalmazó mutáns.



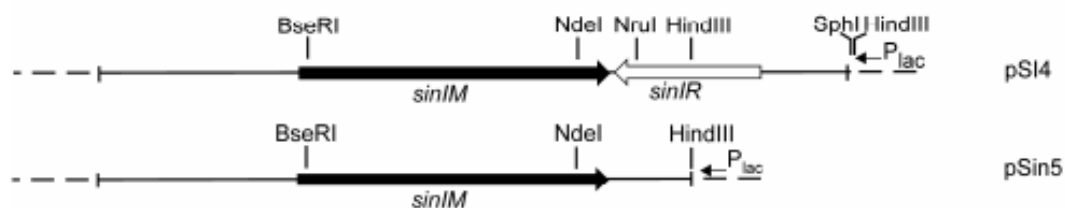
11. ábra: A vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó plazmidok metiláltsága.

Az *E coli* DH10B sejtekből izolált plazmidokat Eco47I (GGWCC), és Cfr13I (GGNCC) restrikciós endonukleázokkal emésztettük, a mintákat 1%-os agaróz gélen elektroforetizáltuk. A minták sorrendje: 1-3:pSin5 (vad típusú M.SinI), 4-6:pSin10-19 (N172S), 7-9:pSin10-106 (V173L) , 10-12:pSin10-5mut (A34V, K44Q, M66T, L214S, Y229H), 13-15:pSau2 (vad típusú M.Sau96I), 16 DNS molekulásúly

marker (Fermentas) Az 1, 4, 7, 10, 13-as minták emésztetlenek, a 2, 5, 8, 11, 14-es mintákat Eco47I enzimmel, a 3, 6, 9, 12, 15-ös mintákat Cfr13I enzimmel emésztettük. A plazmidok 2 GGWCC, és 8 GGSCC helyet tartalmaznak. A belső citozinnál (aláhúzással jelölve) metilált GGWCC, és GGSCCC helyek rezisztensek az Eco47I, illetve Cfr13I emésztéssel szemben.

IV.3.2. Baktériumsejtek GGWCC specifikus endonukleázal szembeni rezisztenciája *in vivo* kísérletben

A restrikciós-modifikációs rendszerek DNS metiltranszferázainak funkciója az, hogy megvédjék a sejt DNS-ét a saját restrikciós endonukleázuktól. A restrikciós enzimes emésztések eredményei alapján arra következtethetünk, hogy a mutáns metiltranszferázok a GGWCC felismerőhelyeket teljes mértékben metilálják (11.ábra Eco47I emésztés). Az izotópos mérésekkel azonban a mutáns klónok nyers sejt kivonataiban alacsonyabb GGWCC aktivitás volt kimutatható mint a vad típusú enzimet tartalmazó kivonatban (Kiss és mtsai, 2001). Ezért megvizsgáltuk, vajon a mutáns SinI metiltranszferázok képesek-e megvédeni a sejtet *in vivo* a SinI endonukleázal szemben. Létrehoztuk a pSI4-106 konstrukciót, amely egyetlen plazmidon hordozza a V173L aminosavcserét tartalmazó SinI metiltranszferáz génjét, és a SinI restrikciós endonukleáz gént. A pSI4-106 plazmidot úgy hoztuk létre, hogy a pSin10-106 (V173L) plazmid HindIII helyébe visszültettük a pSI4-ből korábban eltávolított ~700 bp-os HindIII fragmentumot (Kiss és mtsai, 2001) helyreállítva ezzel a SinI endonukleáz gént. A pSin5 (a pSin10-106 ettől egyetlen nukleotidcserében különbözik, a V173L aminosavcserét eredményezve) és a pSI4 plazmidok sematikus rajzát a 12. ábra mutatja.



12.ábra: A pSI4 és a pSin5 plazmidok sematikus rajza

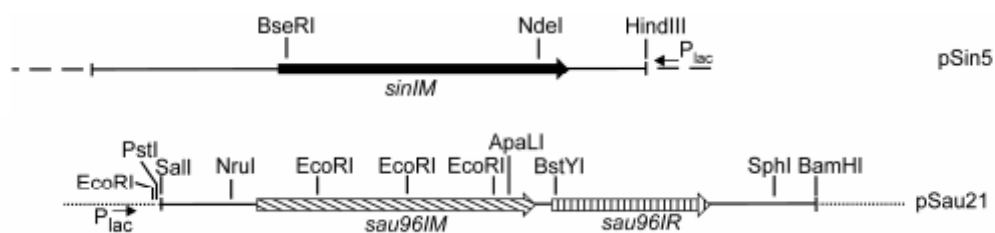
A pSin5 a pSI4 plazmid HindIII deléziós származéka.

A pSI4-106 plazmiddal transzformált baktériumsejtek normális növekedést mutattak, tehát a V173L aminosavcserét hordozó mutáns GGWCC-specifikus aktivitása elég nagy ahhoz, hogy a sejt saját DNS-ét megvédje a SinI endonukleázal szemben. Az N172S és az 5 aminosavcserét hordozó változatokkal nem végeztünk ilyen kísérletet, az *in vitro*

enzimmérések alapján feltételezzük, hogy az utóbbiak is hasonló fenotípust mutatnának *in vivo*.

IV.3.3. A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek GGNC specifitású endonukleázzal szembeni rezisztenciája *in vivo* kísérletben

Az előző kísérletekben bizonyítottuk, hogy a mutáns metiltranszferázok képesek megvédeni a sejtet saját GGWCC-specifitású restriktív endonukleázzal szemben. A következőkben kíváncsiak voltunk, vajon képesek-e ezek a metiltranszferázok védelmet nyújtani a baktériumsejteknek egy GGNC-specifitású endonukleázzal szemben. A pSau21 plazmid tartalmazza a teljes Sau96I restriktív-modifikációs rendszert, a ColE1 replikációs origóval kompatibilis p15A replikációs origót tartalmaz, kanamicin rezisztenciát hordoz, és a Sau96I metiltranszferáz génje könnyen deletálható a plazmidból. A 13. ábra a pSin5 és a pSau21 plazmidok sematikus rajzát mutatja, a fontosabb restriktív endonukleáz helyekkel.



13. ábra: A pSin5 és a pSau21 plazmidok sematikus rajza

A pSau21 négy EcoRI hasítóhelyet tartalmaz, ezzel az enzimmal emésztve, majd ligálva a plazmidot, a Sau96I metiltranszferáz gén nagy része eltávolítható, míg a vektor, és a Sau96I endonukleáz gén intakt marad. ER1398 baktériumsejteket, melyek tartalmazták a mutáns SinI metiltranszferáz géneket kódoló (N172S és V173L) plazmidokat, transzformáltunk az EcoRI-gyel emésztett, majd ligált pSau21 plazmiddal. Kontrollként olyan baktériumsejteket használtunk, amelyek a pSau1 (Sau96I metiltranszferáz gént kódoló) plazmidot hordozták. Csak a pSau1 plazmidot tartalmazó baktériumsejtek transzformálása esetén kaptunk Ap/Kan kettős rezisztenciát tartalmazó telepeket, tehát a mutáns SinI metiltranszferázok nem voltak képesek megvédeni a sejtet egy GGNC specifikus endonukleáztól. Az eredmény nem meglepő, hiszen a mutáns metiltranszferázok nem mutatnak teljes GGNC rezisztenciát (11. ábra).

A kontroll kísérletben a kettős, Ap/Kan rezisztenciát mutató telepekből plazmidot izoláltunk, valóban a pSau1 plazmidot és a pSau21 EcoRI deléciós származékát tartalmazták.

IV.4. A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképességének vizsgálata szabályozható expressziójú GGNC specifitású endonukleázzal szemben

Annak érdekében, hogy a mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek GGNC endonukleázzal szembeni rezisztenciáját érzékenyebben vizsgálhassuk, kidolgoztunk egy *in vivo* rendszert, amelyben a baktériumsejtek életképességét egy GGNC-specifikus endonukleáz (Sau96I) változtatható szintje mellett tesztelhetjük. Ehhez létrehoztuk egy olyan plazmidot, amely a vad és a mutáns SinI metiltranszferáz géneket hordozó plazmidok replikációs origójával kompatibilis replikációs origót, valamint ezekről (pSin5 és származékai) eltérő antibiotikum rezisztenciát hordoz. A konstrukciót pOK-BAD-nak neveztük el, és a következőképpen készítettük: a pOK12 (közepes kópiaszámú, Kan^R) plazmidot StuI-FspI enzimekkel emésztettük, a keletkezett 1838 bp-os fragmentumot ligáltuk a pBAD24 (Guzmann és mtsai., 1995) 1830bp-os ClaI-PaqI fragmentumával, melynek végeit Klenow polimerázzal feltöltöttük. A keletkezett pOK-BAD plazmid tartalmazza a pOK12-ből származó replikációs origót (p15A), és a kanamicin rezisztenciagént, valamint a pBAD24-ből származó araC regulátorgént, az araBAD promotert, a multiklónozó helyet, és az rrnB terminátor szekvenciát. Az AK143 és AK144 primerekkel amplifikált Sau96I endonukleáz gént pTZ57R/T vektorba ligáltuk, NcoI és XbaI enzimekkel emésztettük, majd az NcoI-XbaI enzimekkel emésztett pOK-BAD vektorba ligáltuk. Az így kapott pOB-R.Sau96I plazmid tartalmazza a Sau96I endonukleáz gént, melynek átíródása az araBAD promotor által szabályozott. Ezen a plazmidon a Sau96I restrikciós endonukleáz transzkripciója glükóz hozzáadásával represszálható, míg arabinózzal indukálható. A csak a pOB-R.Sau96I plazmidot tartalmazó sejtek még glükóz jelenlétében sem voltak életképesek, míg ha a sejtek pSTC-MSau96I (M.Sau96I metiltranszferáz kódol, hőérzékeny replikációs origójú, Cm^R) plazmidot is tartalmaztak, stabilan fenntarthatóak voltak 30°C-on. A pOB-R.Sau96I és pSTC-M.Sau96I plazmidokat tartalmazó DH10B baktériumsejtek normálisan nőttek 30°C-on mind 0.2% glükóz, mind 1% arabinóz jelenlétében, 42°C-on viszont glükóz represszor jelenlétében sem kaptunk életképes klónokat. Ez azt mutatja, hogy az arabinóz promoterről kifejeződő Sau96I endonukleáz szintje még glükóz represszor jelenlétében sem nulla. A pSTC-M.Sau96I plazmidban van egy HpaI hely (az M.Sau96I génben), míg a pOB-R.Sau96I nem tartalmaz HpaI hasítóhelyet. A HpaI-emésztett pOB-R.Sau96I/pSTC-M.Sau96I plazmidkeveréket DH10B sejtekbe transzformáltuk, glükózt tartalmazó táptalajra szélesztettük, majd 42°C-on inkubáltuk. Két Kan^R/Cm^S transzformánst kaptunk, de ezek a

Sau96I endonukleáz gén deléciós származékát tartalmazták. Ez a kísérlet is azt bizonyítja, hogy glükóz hozzáadásával sem tudjuk teljes mértékben represszálni az arabinóz promoterről induló endonukleáz transzkripciót.

IV.4.1. A sejten belüli arabinózkoncentráció szinkronizálása

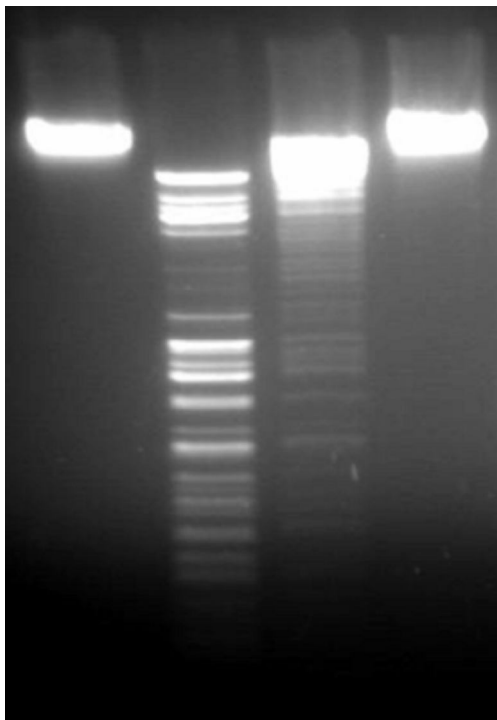
A pSin5 (vad M.SinI), és a mutáns metiltranszferázokat (pSin10-19, pSin10-106, és pSin10-5mut) tartalmazó DH10B baktériumsejteket HpaI enzimmel emésztett pOB-R.Sau96I/pSTC-M.Sau96I plazmidokkal transzformáltuk, LB/Ap/Kan/glükóz lemezekre szélesztettük. A pSin5 és pOB-R.Sau96I plazmidokat tartalmazó transzformánsok glükóz represszió mellett rövid ideig fenntarthatóak voltak. Tartós növesztés során mutációk halmozódnak fel, inaktíválva az R.Sau96I endonukleáz gént. A vad, illetve mutáns metiltranszferáz géneket hordozó plazmidokat (pSin5, pSin10-19, pSin10-106, illetve pSin10-5mut) tartalmazó baktériumsejteket HpaI-emésztett pOB.RSa96I/pSTC-M.Sa96I plazmidkeverékkel transzformáltuk, a sejteket LB/Ap/Kan lemezekre szélesztettünk, 42°C-os termosztátban inkubáltuk a lemezeket. Az Ap^R/Kan^R/Cm^S baktériumsejteket folyadékon növesztettük, az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon hígítási sort készítettünk, és glükózt, valamint különböző mennyiségű arabinózt tartalmazó LB/Ap/Kan lemezekre csepegtettünk a hígított kultúrákból. A kísérletek nem voltak megbízhatóak, reprodukálhatóak. Több esetben a vad típusú M.SinI-et tartalmazó telepek bizonyultak a leginkább életképesnek. Más *E. coli* baktériumtörzsekben is elvégeztük a kísérletet, de a kapott eredmények továbbra sem voltak értékelhetők, megismételhetők. Több publikáció is szól arról, hogy az araBAD operonról induló transzkripció ugyan szabályozható különböző koncentrációjú arabinózzal, de ez a szabályozás nem egyedi sejtekre vonatkozik (Khlebnikov és mtsai, 2001). A különböző mennyiségű arabinóz jelenlétében a sejtek egy bizonyos százaléka teljes indukció, más része gyakorlatilag teljes represszió alatt van. Ez a jelenség a sejtekben működő, arabinóztól függő arabinóz transzporter működése miatt van. A cikk szerzői egy arabinóztól független, konstitutív promoter irányítása alá helyezték az arabinóz transzportert. Bizonyították, hogy így a tenyészet minden sejtjében egyformán lehet az arabinóz koncentrációval szabályozni a transzkripció intenzitását. A publikáció szerzőitől elkértük ezt a plazmidot (pJAT13araE). A pJAT13araE ColE1 (pSin5 és származékai) és p15A (pOB-R.Sau96I) replikációs origókkal kompatibilis pBBR1 replikációs origót, valamint gentamicin (Gm), és eritromicin (Em) rezisztenciagéneket tartalmaz. A pJAT13araE plazmidot tartalmazó DH10B baktériumsejteket transzformáltuk a metiltranszferáz géneket tartalmazó plazmidok valamelyikével (pSau2, pSin5, pSin10-19, pSin10-106, illetve pSin10-5mut), majd végül a HpaI enzimmel emésztett pOB-R.Sau96I/pSTC-M.Sau96I plazmidokkal. A transzformánsokat LB/Ap/Kan/Gm/glükóz tartalmú lemezeken, 42°C-on inkubáltuk. A 3

plazmidot tartalmazó transzformánsok metiláltsági állapota restriktív enzimes emésztéssel vizsgálva megegyezett a csak metiltranszferáz-plazmidokat tartalmazó (11. ábra) minták metiláltsági mintázatával.

IV.4.2. A sejten belüli Sau96I endonukleáz szint

Megvizsgáltuk, vajon kísérleti körülményeink között arabinóz indukció hatására mekkora a sejten belüli Sau96I endonukleáz szint. pJAT13ara+pSau2+pOB-R.Sau96I plazmidokat tartalmazó *E. coli* DH10B sejteket növesztettünk, majd 0.005% arabinózzal indukáltunk, nyers sejt kivonatot készítettünk az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon. A sejt kivonatot különböző hígításaival λ fág DNS-t emésztettünk, meghatározva a Sau96I endonukleáz szintet (14. ábra). A 10-szeresére hígított sejt kivonatot a fág DNS tökéletes emésztését eredményezte, jelezvén a sejten belüli magas endonukleáz aktivitást.

1. 2. 3. 4.



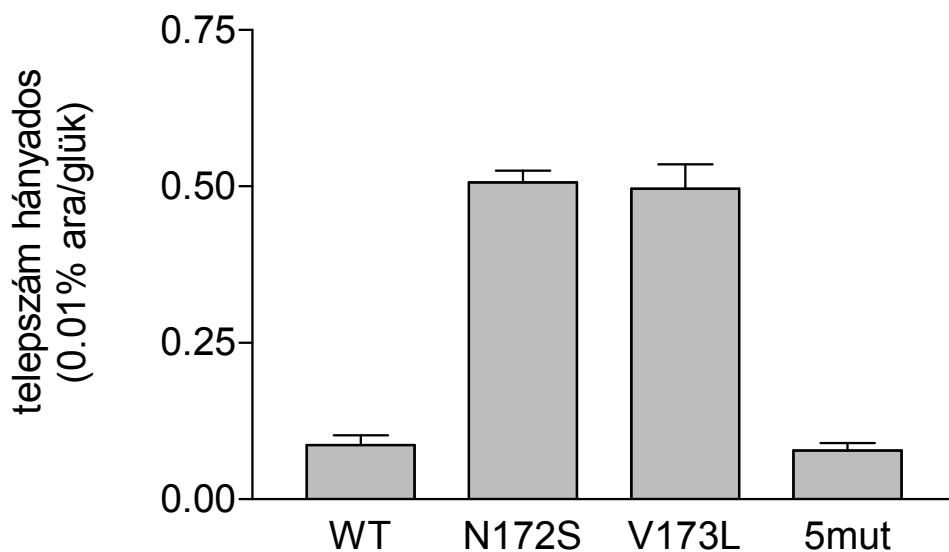
14. ábra: Sau96I endonukleáz aktivitás nyers sejt kivonatokban

A pJAT13araE+pSau2+pOB-R.Sau96I plazmidokat tartalmazó *E. coli* DH10B sejteket 0.005% arabinózzal indukáltunk. A nyers sejt kivonatok hígításainak endonukleáz aktivitását λ fág DNS-en teszteltük, a mintákat 1%-os agaróz gélen elektroforezizáltuk. A minták sorrendje a következő volt: 1. emésztetlen λ fág DNS, 2. 10x hígított sejt kivonatok, 3. 100x hígított sejt kivonatok, 4. 1000x hígított sejt kivonatok

IV.4.3. A vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképességének vizsgálata szabályozható expressziójú GGNCC specifitású endonukleázal szemben

A vad és a mutáns SinI metiltranszferázokat tartalmazó, valamint különböző mennyiségű Sau96I endonukleáz tartalmazó baktériumsejtek életképességére telepformáló képességükből következtettünk az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon. A kísérlet előzményeként először az azonos optikai denzitású mintákból 5-5 µl-eket csepegtettünk glükózt, illetve arabinózt tartalmazó LB/Ap/Kan/Gm agarlemezekre. Már igen kis mennyiségű (0.0001%) arabinóz jelenlétében a vad típusú metiltranszferázt tartalmazó baktériumsejtek élősejtszáma drámai csökkenést mutatott.

A vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejteket LB/Ap/Kan/Gm/glükóz tápfolyadékban növesztettük, majd a tenyészeteket azonos optikai denzitásúra hígítottuk. Ezekből a kultúrákból 100-100 µl-eket szélesztettünk LB/Ap/Kan/Gm/0.2% glükóz, illetve LB/Ap/Kan/Gm 0.01% arabinózt tartalmazó lemezekre, majd meghatároztuk a lemezeken a telepszámokat. (15. ábra)



15. ábra: A vad és a mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek telepformáló képessége szabályozható expressziójú GGNCC specifitású endonukleáz mellett.

A különböző metiltranszferázokat tartalmazó baktériumtenyészeteket az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon növesztettük, majd azonos optikai denzitásúra hígítottuk. A mintákból 100-100 µl-eket szélesztettünk glükózt, illetve 0.01% arabinózt tartalmazó lemezekre. Az oszlopok az arabinóz/glükóz lemezeken számolt élősejtszám hányadost mutatják. Mindegyik érték öt-nyolc párhuzamos kísérlet eredménye. Az adatokat a Prism programmal elemeztük, az ábrán a szórást is feltüntettem.

Az N172S és V173L mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek telepformáló képessége kb. ötször volt magasabb a vad típusú, illetve 5 aminosavcserét hordozó metiltranszferázot tartalmazó sejtekénél. Ez azt mutatja, hogy az N172S és V173L mutánsok képesek megvédeni *in vivo* nemcsak a GGWCC helyeket, de nagymértékben metilálják a GGSCC helyeket is, megnövekedett védelmet nyújtva a sejteknek a GGNCB specifitású Sau96I endonukleázzal szemben. Meglepő, hogy bár a pSin10-5mut metiláltsági állapota nem volt sokkal kisebb mértékű, mint a másik két mutánsé (11. ábra), mégis telepformáló képessége az életképességi tesztben nem volt jobb, mint az M.SinI-et (vad típus) tartalmazó sejteké.

Az N172S és V173L mutáns metiltranszferázokat tartalmazó klónok megnövekedett életképessége a Sau96I endonukleáz inaktiválódása miatt is történhetett. Hogy kizárjuk ennek a lehetőségét, a három plazmidot tartalmazó transzformánsokból (pJAT13araE+pOB-R.Sau96I+pSin10-19, illetve pSin10-106) plazmidpreparátumot készítettünk, pSTC-M.Sau96I plazmidot tartalmazó DH10B sejteket transzformáltunk, Kan^R/Cm^R/Ap^S klónokra szelektáltunk 30°C-on. A következő lépésben a 30°C-on felnőtt Kan^RCm^R sejteket 42°C-ra tettük Km/arabinózt tartalmazó táplemezre. Minden esetben 30°C-on életképes sejteket kaptunk, míg 42°C-on nem voltak életképesek. Abban az esetben, ha a transzformánsok inaktív Sau96I endonukleáz tartalmaznak, 42°C-on arabinóz jelenlétében is életképes klónokat kapunk, kísérletünkben azonban 42°C-on nem kaptunk növekedést. Ezzel a kísérlettel bizonyítottuk, hogy az N172S és V173L mutánsokkal kapott megnövekedett életképesség valóban a mutánsok megnövekedett GGSCC aktivitásának köszönhető, nem pedig a funkcióképtelen endonukleáznak.

Az N172S és V173L mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek képesek voltak arabinóz tartalmú lemezekon kolóniát formálni, azonban új (arabinózos) lemezre, vagy folyadékra átváltoztatva nem voltak életképesek. Ez azt mutatja, hogy a GGSCC helyek metiláltsága nem teljes, a sejtek hosszú távú túléléséhez nem elegendő a metilációs aktivitás. Az arabinózos lemezen felnőtt sejteket továbboltva glükózt tartalmazó lemezre, vagy folyadékra, a baktériumsejtek normálisan növekedtek. A folyadékon felnőtt kultúrákból izolált plazmid DNS az eredeti plazmidokkal megegyező metiláltsági állapotú volt.

A következő életképességi tesztben azt vizsgáltuk, vajon a glükóz, illetve 0.01% arabinózos lemezen felnőtt telepek mennyi életképes sejtet tartalmaznak. A kísérletekbe csak az N172S és V173L metiltranszferázokat vontuk be. A glükózon, illetve arabinózon felnőtt telepekből 1-1, kb. azonos méretű kolóniát 100 µl LB-ben felfuszpendáltuk, majd 10-es léptékű hígítási sort készítettünk (a kísérlet során mind az N172S, mind a V173L esetében 5-5 párhuzamossal dolgoztunk). A különböző hígításokból 5-5 µl-eket cseppentettünk LB/Ap/Kan/Gm/glükóz lemezekre. Az eredetileg arabinózt tartalmazó

lemezen felnőtt sejtek 10-100-szor kevesebb élő sejtet tartalmaztak, mint a glükóz tartalmú lemezen felnőtt sejtek.

IV.5. A DNS ligáz hatása az endonukleázt tartalmazó sejtek életképességére

A részleges védelem, melyet az N172S és a V173L mutánsok nyújtanak a sejtnak meglepő, hiszen a plazmidok ugyan részlegesen, de emészthetők Sau96I endonukleázzal (a plazmidon 8 GGSCC hely van). Ha a plazmid emészthető, akkor az *E. coli* kromozómán található 4218 (Pósfai János személyes közlése) GGSCC helyek egy része sincs védve. Hogyan képes a sejt ezt túlélni? Feltételeztük, hogy ez a védelem az *E. coli* DNS ligáz enzimnek köszönhető, amely egy bizonyos határig képes a sejtben az endonukleáz által okozott kettős szálú DNS törések javítására. Feltételezésünket két megfigyelés támasztja alá. Kimutatták, hogy az *E. coli* DNS ligáz olyan sejtekben, melyek nem tartalmazzák az EcoRI metiltranszferázt, képes egy bizonyos szintig kijavítani az EcoRI endonukleáz által okozott kettős szálú DNS töréseket (Heitman és mtsai., 1989.). Szintén a DNS ligáz védő szerepét írták le a PvuI restriktív-modifikációs rendszer klónozásakor. A PvuI restriktív endonukleázt tartalmazó vad típusú (azaz funkcióképes DNS ligázt tartalmazó) *E.coli* sejtek életképesek voltak PvuI modifikációs metiltranszferáz nélkül is, azonban ha a DNS ligázt hőérzékeny plazmidra helyezték, majd olyan hőmérsékleten inkubálták a sejteket, ahol a DNS ligáz már nem termelődik, a sejtek életképtelenek lettek (Smith és mtsai., 1992.).

Feltételezésünk az volt, hogy esetünkben az az *E. coli* sejt, melynek GGSCC helyei nem teljes mértékben metiláltak, mégis képes lehet növekedni a GGNCC specifikus endonukleáz mellett a DNS ligáz védő hatása miatt. Kísérletesen teszteltük hipotézisünket. A pMSin-RSau plazmid (Ap^R) egy hibrid restriktív-modifikációs rendszert kódol, a SinI metiltranszferáz gént, és a Sau96I endonukleáz gént, mindkettő saját promotoráról íródik át (16.ábra).



16. ábra: A hibrid restriktív-modifikációs rendszert hordozó pMSin-RSau sematikus rajza.

Létrehoztuk ennek egy olyan változatát, mely a SinI metiltranszferáz V173L aminosavcserét hordozó allélját tartalmazza. A SinI metiltranszferáz gén két StyI restriktív hasítóhelyet tartalmaz, a StyI fragmentumon található a V173L aminosavcserét okozó nukleotid is. A

pMSin-RSau plazmidot StyI enzimmal emésztettük, alkalikus foszfatázzal kezeltük, és a pSin10-106-ból származó 278bp-os StyI fragmentummal ligáltuk, létrehozva a pMSin(V173L)-RSau konstrukciót. Az SinI(V173L) metiltranszferáz nem képes teljes mértékben metilálni a GGSCC helyeket, ezért a pMSin-RSau, és a pMSin(V173L)-RSau plazmidokat pSTC-M.Sau96I plazmidot tartalmazó sejtekben tartottuk fenn 30°C-on. A pLG2520 plazmidból, egy 2.7kb-os NheI-BamHI fragmentumot (a DNS ligáz génjét tartalmazza) átültettünk a pOK12 vektorba. Az NheI-BamHI fragment végeit Klenow polimerázzal feltöltöttük, majd az EcoRV emésztett pOK12 vektorba ligáltuk. A létrejött plazmid a pOK-ligA (Kan^R), ebben a konstrukcióban a DNS ligáz gén saját promoteréről íródik át. Ellenőriztük, vajon funkcióképes ligáz termelődik-e a pOK-ligA plazmidról. Az N2604 *lig ts7* (Gottesman és mtsai., 1973.) *E. coli* baktériumtörzs DNS ligáza hőérzékeny. A DNS ligáz az *E. coli* sejtek számára esszenciális, a törzs képes növekedni 30°-on, míg 42°C-on nem. A pOK-ligA plazmiddal transzformált N2604 *lig ts7* baktériumsejtek képesek voltak növekedni 42°C-on, jelezvén hogy a pOK-ligA plazmidról funkcióképes ligáz enzim termelődik. A pOK-ligA plazmidot tartalmazó ER1398 sejteket transzformáltunk pMSin-RSau/pSTC-M.Sau96I plazmidpreparátummal, LB/Ap/Kan lemezekre szélesztettünk, 42°C-on inkubáltunk. (30°C-on LB/Cm lemezen vizsgáltuk a pSTC-M.Sau96I plazmid jelenlétét, illetve eltűnését) Különböző méretű Ap^R/Kan^R/Cm^S kettős rezisztens transzformánsokat kaptunk, de ezeket tovább oltva sem lemezen, sem folyadékon nem kaptunk növekedést. Negatív kontrollként pOK12 plazmidot tartalmazó ER1398 sejteket transzformáltunk pMSin-RSau/pSTC-M.Sau96I plazmidpreparátummal, majd LB/Ap/Kan lemezekre szélesztettünk. Ebben az esetben sem kaptunk életképes Ap^R/Kan^R kettős rezisztens klónokat a 42°C-on történő növesztés során. A pOK-ligA plazmidot tartalmazó ER1398 sejteket transzformálva pMSin(V173L)-RSau/pSTC.MSau96I plazmidokat tartalmazó preparátummal stabil Ap^R/Kan^R/Cm^S klónokat kaptunk 42°C-on. A V173L mutáns metiltranszferázt tartalmazó klónok kb 10%-a LB/Ap/Kan folyadékon sűrűre nőtt. Az izolált plazmidok részlegesen emészthetőek voltak Cfr13I enzimmal (GGNCC), jelezvén, hogy nem tartalmaznak M.Sau96I metiltranszferázt. A kultúrákból nyers sejt kivonatot készítettünk, teszteltük Sau96I endonukleáz aktivitásukat az Anyagok és Módszerek fejezetben leírt módon. A klónok funkcióképes Sau96I endonukleázt termeltek, tehát a megnövekedett életképesség valóban az *E.coli* DNS ligáz védőhatásának köszönhető. Kontrollként a pMSin-RSau plazmid egy olyan változatával dolgoztunk, amely a SinI metiltranszferáz gén deléciós változatát hordozta. Ebben az esetben nem kaptunk életképes, kettős antibiotikum rezisztenciával rendelkező telepeket, jelezve, hogy a DNS ligáz önmagában nem képes védelmet nyújtani a baktériumsejteknek a Sau96I endonukleázzal szemben.

Az 5.táblázatban összefoglaltam a vad és mutáns metiltranszferázok különböző specifitású endonukleázokkal szemben nyújtott védő hatását. A táblázat csak a legfontosabb

kísérleteket tartalmazza, és csak a legfontosabb fehérjét mutatja, nem jeleztem a hőérzékeny replikációs origójú M.Sau96I metiltranszferázt, valamint az arabinóz transzportert sem.

1.plazmid által kódolt releváns fehérje	2. plazmid által kódolt releváns fehérje	életképesség
M.SinI, vagy N172S vagy V173L	R.Sau96I	∅
M.Sau96I	R.Sau96I	normál növekedés, stabil klón
M.SinI-R.SinI (azonos plazmidon)		normál növekedés, stabil klón
V173L-R.SinI(azonos plazmidon)		normál növekedés, stabil klón
M.SinI vagy N172S vagy V173L vagy 5mut	R.Sau96I (változtatható expresszió)	telepformáló képesség 15.ábra
M.SinI-R.Sau96I	T4 DNS ligáz	∅
V173L-R.Sau96I	T4 DNS ligáz	klónok 10%-a életképes,működő R.Sau96I

5.táblázat: A vad és mutáns SinI metiltranszferázok *in vivo* nyújtotta védelem R.SinI és R.Sau96I endonukleázokkal szemben.

V. Az eredmények értékelése

V.1. Megváltozott specifitású SinI metiltranszferáz előállítása random mutagenézissel

Doktori munkám során célunk megváltozott specifitással rendelkező metiltranszferázok izolálása volt, *in vitro* mutagenézis technika alkalmazásával. A csoport (Kiss és mtsai., 2001) már korábban izolált két megváltozott specifitású mutáns SinI metiltranszferázt (N172S és V173L aminosavcserék), melyek a vad típusú enzimnél magasabb GGSCC aktivitással rendelkeztek. A mutációkat okozó aminosavcserék az enzim nagy doménjében található, ez a domén a DNS kis árki felszínével létesít kapcsolatot. Az általánosan uralkodó felfogás szerint a DNS metiltranszferázok szekvenciaspecifitását kizárólag a variábilis régió határozza meg, amely az enzimek kis doménjének alkotásában vesz részt, és a DNS nagy árki felszínével lép kapcsolatba. Munkám során tesztelni kívántuk azt a hipotézist, hogy a SinI metiltranszferáz esetén (és valószínűleg minden olyan metiltranszferáz esetén, melyek a felismerőszekvencián belüli A/T, illetve G/C bázispárok közötti diszkriminációt végeznek) az A/T illetve G/C elkülönítés az enzim nagy doménje és a DNS kis árka közötti kapcsolatok révén valósul meg. Célunk új, megváltozott specifitású enzimek izolálása volt, melyek a vad típusú enzimnél magasabb GGSCC aktivitással rendelkeznek. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a mutagenézis során használt *in vitro* evolúciós technikák alkalmasak-e megváltozott specifitású metiltranszferázok előállítására. Nagyon sokan, nagyon régóta próbálkoztak már megváltozott specifitású metiltranszferázok előállításával, de az irodalomból az erőfeszítések ellenére igen kevés sikeres kísérlet ismert.

A vad típusú SinI metiltranszferázt kódoló gént PCR technikák alkalmazásával mutagenizáltuk, majd DNS keverést végeztünk, ezáltal a mutagenizált fragmentumok random rekombinációját hajtottuk végre. Végül erős *in vitro* szelekció alkalmazásával izoláltunk egy mutáns SinI metiltranszferázt, mely az eredeti GGA/TCC szekvenciák mellett a GGG/CCC szekvenciákat is nagymértékben képes volt metilálni. A mutáns gén kilenc nukleotidcserét tartalmazott, ebből öt aminosavcserét okozott a kódolt fehérjében. Három egymáshoz közeli mutáció a fehérje N-terminális részén (A34V, K44Q, M66T), kettő egymáshoz szintén közeli (L214S, Y229H) a konzervált VI. és VII. régiókat összekötő részben található. A mutációkat szeparáltuk, létrehoztunk olyan mutáns enzimeket, melyek csak a három N-terminális, illetve csak a két belső aminosavcserét tartalmazzák. Az öt aminosavcserét, illetve a csak két belső aminosavcserét hordozó mutáns enzimek egymáshoz nagyon hasonlóak voltak, jelezvén, hogy a N-terminálison levő mutációk hozzájárulása a megváltozott fenotípushoz minimális.

A két belső aminosavcserét (L214S és Y229H) tartalmazó mutáns enzimet közel homogenitásig tisztítottuk, és megállapítottuk steady-state kinetikai paramétereit. A vad típusú enzimhez képest az eredeti GGA/TCC szubsztrátra mutatott k_{cat}/K_m érték kb. ötödére csökkent a mutáns enzimnél, míg ugyanezen érték a GGG/CCC szubsztrátra kb. hússzorosára nőtt. A GGG/CCC szubsztrátra mutatott növekedés a k_{cat} érték nagymértékű növekedésének tudható be, a mutáns enzim G/C közepű szubsztrátra 40-szer magasabb k_{cat} értékkel rendelkezik, mint a vad típusú enzim.

A metiltransferázok szekvenspecifitásával, azok megváltoztatásával számos kutatócsoport próbálkozott különböző technikák alkalmazásával. Ennek ellenére az irodalomból kevés, valóban sikeres kísérlet ismert. Egy ilyen sikeres próbálkozás volt az EcoRV metiltransferáz szekvenspecifitásának megváltoztatása (Roth és Jeltsch, 2001) Irányított mutagenézissel létrehoztak olyan EcoRV enzimvariánst, amely a felismerőszekvencián (GATATC) belüli adenin helyett (GATATC, aláhúzással jelölve a metilált adenin) egy másik szubsztrátot, a GCTATC felismerőszekvenciát is képes volt metilálni (GCTATC a metilált citozin aláhúzva). A vad típusú enzim mindkét bázist képes metilálni, preferálva az adenint. A mutáns enzim gyakorlatilag csak a citozin nukleotidot metilálta, ez a változás azonban az általános katalitikus aktivitás nagyfokú csökkenésével járt. Fontos azonban megjegyezni, hogy itt egy teljesen új specifitású enzimet hoztak létre egy eredetileg N6 adenin metiltransferázból N4 citozin metiltransferáz lett. Egy másik sikeres kísérlet során *in vitro* evolúciós technikák alkalmazásával, és egy nagyon elegáns új technika, az *in vitro* kompartmentalizáció segítségével izoláltak egy megváltozott specifitású HaeIII metiltransferázt (Cohen és mtsai., 2004). A mutáns enzim katalitikus aktivitása minden esetben magasabb volt, mint vad típusú HaeIII metiltransferáz elsődleges (GGCC), és másodlagos (AGCC) szubsztrátokra mutatott aktivitása. Lehet vitatkozni, hogy az irányított evolúciós, vagy a random technikák alkalmasabbak-e enzimek specifitásának, katalitikus aktivitásának, hőstabilitásának stb. megváltoztatására. Mindkét eljárásnak megvannak a maga pro és kontra érvei, mindkettő megfelelően alkalmazva hatásos fegyver lehet az enzimek mesterséges evolúcióját tanulmányozó kísérletekben. Az EcoRV és a HaeIII metiltransferázok szekvenspecifitásának megváltoztatása a fehérjék háromdimenziós szerkezetének ismeretében, célzott aminosavcserékkel, illetve célzott régió megváltoztatásával valósult meg. Véleményem szerint a fehérje szerkezetének ismeretében a célzott fehérjetervezési technikák alkalmasabbak a kívánt enzim létrehozására. Esetünkben azonban a SinI metiltransferáz szerkezete nem állt, és még most sem áll rendelkezésre, ezért fordultunk a random mutagenézist alkalmazó evolúciós technikákhoz. Ezen technikák alkalmazása kísérleteink során a C5-metiltransferázokról szerzett ismereteinket fontos elemmel bővítették. Megállapítottuk, hogy legalábbis a SinI metiláz esetén nem a variábilis régió a szekvenspecifitás egyedüli meghatározója. Kiss Antal és

munkatársai (Kiss és mtsai, 2001) megállapították, hogy a SinI metiltranszferáz esetében a szekvensspecifikus DNS felismerés egyik aspektusa, a felismerőszekvencián belüli A/T és G/C bázispárok elkülönítése az enzim nagy doménje, és DNS kis árka közötti kapcsolatok révén valósul meg. Doktori munkámban az *in vitro* evolúciós technikákkal előállított 5 aminosavcserés SinI metiltranszferáz pedig alátámasztja ezt a korábbi felismerést, azaz a megváltozott szekvensspecifitásért felelős aminosavcserék ebben az esetben is az enzim nagy doménjében található, mely a DNS kis árkával létesít kapcsolatot. Eredményeinket 2004-ben publikáltuk, azóta számos publikáció jelent meg a bakteriális metiltranszferázok szekvensspecifitását megváltoztató témakörben. Számunkra igen fontos két publikáció: Gerasimaite és munkatársai, valamint Chahar és munkatársai a tervezett fehérjemérnökség és a random mutagenizist alkalmazó evolúciós technikákat kombinálva új tulajdonságú, megváltoztatott szekvensspecifitással bíró metiltranszferáz enzimeket állítottak elő. Gerasimaite és munkatársai (Gerasimaite és mtsai., 2009) a GCGC szekvensspecifitással rendelkező HhaI-ből kiindulva fejlesztettek ki egy új GCG specifitású metiltranszferázt, az új variáns általános katalitikus aktivitása a vad típusú enziméhez hasonló volt. Chahar és munkatársai (Chahar és mtsai, 2010) szintén kombinálták a tervezett fehérjemódosítást a random mutagenizist alkalmazó evolúciós technikákkal. A munka során az *Escherichia coli* Dam metiltranszferáz felismerőspecifitását változtatták meg, a mutáns enzim az eredeti GATC szekvenciák helyett a GATT szekvenciákat metilálja és a mutáns enzim metilációs aktivitása összevethető a vad típuséval. Úgy gondolom, hogy a C5 metilázok szekvensspecifitásának megváltoztatására a legalkalmasabb a tervezett, és a random evolúciós technikák kombinációjának alkalmazása. A jövőben érdekes kísérlet lenne a SinI metiltranszferáz enzim variábilis régiójának megváltoztatása random oligonukleotidok segítségével, és megváltozott, GGSCC specifitású mutánsok keresése, analízise. Munkacsoportunk eredményei alapján kijelenthetjük, hogy a SinI metiláz enzim esetén a szekvensspecifikus DNS felismerést nem kizárólag a variábilis régió határozza meg. Kíváncsiak lennénk, hogy csak a variábilis régió mutációi milyen mértékben befolyásolják a DNS felismerést, az enzim kinetikai paramétereit, illetve a már meglévő, nagy doménben található mutációkkal kombinálva milyen új tulajdonságú enzimek állíthatók elő.

V.2. A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképességének vizsgálata különböző specifitású endonukleázokkal szemben

A modifikációs metiltranszferázok feladata a restrikciós-modifikációs rendszerekben, hogy megvédjék a sejt DNS-ét a saját restrikciós endonukleázától. Megvizsgáltuk, vajon a megváltozott specifitású mutáns SinI metiltranszferázok (melyek eredeti specifitása GGWCC) képesek-e védelmet nyújtani a sejteknek egy GGNCC-specifitású Sau96I

endonukleázzal szemben. A kísérlet során a mutáns metiltranszferázok és az endonukleáz gének átírását is saját promoterük irányította. A mutáns metiltranszferázok nem nyújtottak védelmet a baktériumsejteknek a Sau96I endonukleázzal szemben. Az eredmény nem meglepő, hiszen a mutáns metiltranszferázokat kódoló plazmidok metiláltsága nem teljes, GGNC specifitású endonukleázzal részlegesen emészhetők (11. ábra). Ha a plazmidok metiláltsága nem teljes, akkor természetesen a baktériumsejtek kromoszómáján található 4218 G/C közepű hely egy része szintén nem teljesen metilált, a Sau96I endonukleáz hasítja ezeket a nem metilált szekvenciákat, a sejt halálát eredményezve. GGWC specifitású endonukleázzal emészve a mutáns metiltranszferázokat kódoló plazmidokat, úgy tűnik, az A/T közepű helyek teljesen metiláltak. A plazmidok azonban kevés, mindössze kettő A/T közepű helyet tartalmaznak, a baktériumsejtek kromoszómáján pedig 2874 ilyen hely található. Ezért teszteltük, vajon *in vivo* képesek-e a mutáns SinI metiltranszferázok védelmet nyújtani a baktériumsejteknek saját SinI endonukleázukkal szemben. Létrehoztunk egy olyan konstrukciót (pSI4-106), amely egyetlen plazmidon hordozza a V173L aminosavcserét tartalmazó mutáns M.SinI gént, és az R.SinI endonukleázt. A metiltranszferáz és az endonukleáz gének átíródását saját promoterük szabályozta. A pSI4-106 plazmiddal transzformált baktériumsejtek normális növekedést mutattak, bizonyítva, hogy a V173L aminosavcserét (és valószínűleg az N172S és az 5 aminosavcserét hordozó mutáns enzim esetében is) hordozó mutáns metiltranszferáz képes védelmet nyújtani a baktériumsejteknek a saját GGWC specifitású endonukleázával szemben.

A mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek nem voltak képesek megvédeni a sejt DNS-ét egy saját promoterének szabályozása alatt álló GGNC specifitású endonukleázzal szemben. Ahhoz, hogy a különböző mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek GGNC specifitású endonukleázzal szembeni rezisztenciáját alaposabban vizsgálhassuk, kidolgoztunk egy *in vivo* rendszert, amelyben a baktériumsejtek életképességét egy GGNC specifikus endonukleáz (Sau96I) változtatható szintje mellett tesztelhetjük. Készítettünk egy olyan plazmidot, amelyben a Sau96I endonukleáz génjének átíródása az arabinóz operon által szabályozott. Baktériumsejteket transzformáltunk a vad és mutáns metiltranszferázokat tartalmazó plazmidokkal, a szabályozható expressziójú Sau96I endonukleáz gént tartalmazó plazmiddal, valamint az arabinóz transzporter gént hordozó plazmiddal. Az arabinóz transzporter gént hordozó segédplazmid tette lehetővé, hogy a baktériumsejteket tartalmazó tenyészet minden egyes sejtjében azonos legyen az arabinóztól függő transzkripció mértéke. A három plazmidot tartalmazó baktériumsejtek telepformáló képességét vizsgáltuk glükóz represszor, és különböző mennyiségű arabinóz (induktor) jelenlétében. A vad típusú SinI metiltranszferázt tartalmazó sejtek már igen kis mennyiségű arabinóz jelenlétében sem voltak életképesek, míg a mutáns N172S és V173L aminosavcserét tartalmazó enzimek még viszonylag nagy arabinóz koncentráció mellett is

magas teleformáló képességgel rendelkeztek (15. ábra). A védelem azonban nem volt teljes, a magas arabinóz koncentrációjú lemezen felnőtt sejtek átoltva tápfolyadékba, vagy lemezre nem adtak életképes klónokat, mutatva hogy a baktériumsejt DNS-e nem teljes mértékben metilált. Meglepő, hogy az 5 aminosavcsérés (A34V, K44Q, M66T, L214S, Y229H) mutáns hordozó plazmid GGSCC helyeinek metiláltsága hasonló volt a másik két mutánséhoz (11. ábra), mégis az életképességi tesztben nem nyújtott nagyobb védelmet, mint a vad típusú enzim. Az N172S és V173L aminosavcséréket hordozó mutánsok egyensúlyi kinetikai paramétereit sajnos nem tudtuk meghatározni, méréseink nem voltak reprodukálhatóak. A GGSCC szubsztátokon mért k_{cat} értékek nagyarányú növekedését mindkét mutáns esetében megállapítottuk. A K_m értékek pontos meghatározása nem sikerült, de úgy gondoljuk, ezen mutánsok értékei alacsonyabbak, mint az 5 aminosavcsérést hordozó mutáns hasonló értékei, és ez okozza az életképességi tesztben mutatott nagyfokú eltéréseket. Az N172S, a V173L és az 5 aminosavcsérés mutáns enzimeket hordozó plazmidok metiláltsági állapota *in vitro* tesztben igen hasonló volt, míg *in vivo* az 5 aminosavcsérés mutáns nem mutatott nagyobb védelmet, mint a vad típusú enzim. Ismerjük az *Escherichia coli* kromoszómán található GGSCC helyek számát, és a sejt térfogatát, ezekből pedig kiszámolható a sejten belüli GGSCC koncentráció, ez körülbelül 1 μ M. A sejten belül 4218 GGSCC hely van, ha ezek 90%-a metilált, a maradék még metilálatlan helyek (kb 400 hely) koncentrációja 100nM. Az 5 aminosavcsérés mutáns K_m értéke 255nM GGSCC szubsztátokra, ez pedig azt jelenti, hogy az utolsó 10% még metilálatlan hely nagyon rossz hatásfokkal metilálódik, ez pedig a sejt szempontjából élet-halál kérdés. Ez persze csak közelítő számítás, a sejtet homogén, kompartmentek nélküli egységként kezeltem, és azzal sem számoltam, hogy minden GGSCC hely azonos mértékben hozzáférhető-e a metiláz számára, és minden hely azonos kinetikával metilálódik-e. Úgy gondoljuk, hogy az életképességi tesztekben nagyfokú védelmet nyújtó N172S és V173L mutánsok k_{cat}/K_m értékei magasabbak GGSCC szubsztátokra, mint az 5 aminosavcsérés mutánsé, és ez teszi lehetővé a Sau96I endonukleázzal szemben mutatott nagyfokú, bár nem teljes védelmet az *in vivo* tesztekben.

Az N172S és V173L mutáns metiltranszferázok nyújtotta részleges védelem némileg meglepő, hiszen a sejt kromoszómáján levő 4218 G/C hely egy része metilálatlan. Az volt a feltevésünk, hogy a sejtek túlélése az *E.coli* DNS ligáz enzimnek köszönhető, amely egy bizonyos határig képes a sejtben az endonukleáz által okozott kettős szálú DNS törések javítására. Hipotézisünket két korábbi megfigyelésre építettük. Kimutatták, hogy az *E.coli* DNS ligáz olyan sejtekben, melyek nem tartalmazzák az EcoRI metiltranszferázt, képes egy bizonyos szintig kijavítani az EcoRI endonukleáz által okozott kettős szálú DNS töréseket (Heitman és mtsai., 1989). A DNS ligáz védő szerepét leírták a PvuI restriktációs

endonukleázzal szemben is, szintén olyan sejtekben melyek nem tartalmazták a PvuI modifikációs metiltranszferázt (Smith és mtsai., 1992).

A hipotézis tesztelésére készítettünk egy olyan plazmidot (pMSin-RSau), amely egy hibrid restriktív-modifikációs rendszert tartalmaz, a SinI metiltranszferáz, és a Sau96I endonukleáz génjét tartalmazza. A két gén kifejeződése saját promoterének szabályozása alatt állt. Ennek a plazmidnak egy olyan variánsát is elkészítettük (pMSinV173L-RSau), amely a vad típusú M.SinI gén helyett a V173L mutációt okozó allélt tartalmazta. Ezeket a plazmidokat ER1398 baktériumsejtekbe transzformálva nem kaptunk életképes klónokat. Ha egy másik plazmidon bejuttatuk ezekbe a sejtekbe az *E.coli* DNS ligáz génjét, a pMSinV173L-RSau esetén a lemezen felnőtt telepek kb 10%-a életképes volt. A vad típusú M.SinI-et tartalmazó konstrukció esetén nem kaptunk életképes klónokat a ligáz gén jelenlétében sem. (A vad és mutáns metiltranszferázok különböző specifitású endonukleázokkal szemben mutatott legfontosabb kísérleti eredményeit az 5. táblázat foglalja össze.)

Úgy gondoljuk, eredményünk és a két korábbi megfigyelés is (Heitman és mtsai., 1989., valamint Smith és mtsai., 1992.) egy általános érvényű ligáz-függő túlélési mechanizmust sugallnak. A restriktív-modifikációs rendszerek izolálásának hőskorában több esetben kaptak olyan életképes klónokat, amelyek csak a restriktív endonukleázt (r^+) tartalmazták, a modifikációs metiltranszferázt nem (m^-). Ezek a meglepő eredmények valamilyen sejtbeli javítómechanizmussal magyarázhatók, az endonukleáz által okozott kettős szálú DNS töréseket a sejt képes kijavítani, életképessé téve a baktériumot. Ismereteink szerint, minden ilyen esetben, ahol r^+m^- életképes klónokat izoláltak, a restriktív enzim működése túlnyúló véget eredményez, amely (a tompa végekkel ellentétben) szubsztrátja az *E.coli* DNS ligáznak. Ilyen életképes r^+m^- klónokat izoláltak a PaeR7I (C/TCGAG) (Gingeras és Brooks, 1983), a TaqI (T/CGA) (Barany, 1987, Slatko és mtsai., 1987) a HaeII (RGCGC/Y), a HgiAI (GWGCW/C), a HinfI (G/ANTC), a PstI (CTGCA/G), a XbaI (T/CTAGA) (Chandrasegaran és mtsai. 1988, az MwoI (GCNNNNN/NGC) (Lunnen és mtsai., 1988), a BanIII (AT/CGAT) (Maekawa és Kawakami, 1990), a BstVI (C/TCGAG) (Vasquez és mtsai., 1991), és a PvuI (CGAT/CG) (Smith és mtsai., 1992) restriktív enzimek esetén. A restriktív enzimek direkt klónozásához használt technika az úgynevezett „endo-blue” módszer. Egy olyan baktériumtörzset használnak hozzá, mely dinD1-LacZ fúziós fehérjét hordoz. A dinD1 (damage inducible) fehérjének a bakteriális SOS válaszban fontos szerepe van. Ha a sejtet valamilyen DNS károsító ágens éri, UV sugárzás, kémiai mutagének, vagy egy restriktív endonukleáz, kettőszálú DNS törések jönnek létre a kromoszómán, elindul az SOS válasz, ezzel együtt a dinD1 fehérje termelődése. A dinD1-lacZ fúziós fehérjével rendelkező baktériumsejt DNS károsodás esetén X-Gal indikátor jelenlétében kék színű telepeket eredményez, ezért hívják „endo-blue” technikának. Az

„endo-blue” technikával izolált restriktív enzimek is túlnyúló véget eredményeznek: TaqI, Tth111I (GACN/NGTC) és a BsoBI (C/YCGRG) (Fomenkov és mtsai., 1994, Ruan és mtsai., 1996). A jövőben szeretnénk elméletünket tesztelni, más endonukleázokat bevonva az *in vivo* vizsgálatokba. Jó lenne *in vivo* tesztrendszerünket finomítani, a ligáz enzim szintjét is változtathatóvá tenni, hogy a különböző metiltranszferáz mutánsok *in vivo* endonukleázzal szemben nyújtott védő hatásaiban kisebb különbségeket is ki tudjunk mutatni.

VI. Összefoglaló

A II. típusú modifikációs enzimek ideális kísérleti objektumok a szekvencia-specifikus DNS-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására. Ezek az enzimek 2-8 bp hosszú DNS szekvenciákat ismernek fel, és nagy pontossággal metilálják azokat. A metiltransferázok egy csoportja, a C5-citozin metiltransferázok szerkezete nagyon hasonló felépítést mutat. A C5 metiltransferázok aminosavsorrendjeinek összehasonlításából kiderült, hogy ezek az enzimek 10 konzervált motívumot tartalmaznak, melyek mindig azonos sorrendben követik egymást. A motívumokból 6 erős, 4 pedig gyengébb konzerváltságot mutat [(Pósfai et al., 1989), (Kumar et al., 1994), 2. ábra]. A VIII. és IX. szekvenciarész között egy változó hosszúságú és aminosavösszetételű, úgynevezett variábilis régió található. Szerkezeti és biokémiai vizsgálatok is alátámasztották, hogy a konzervált motívumok felelősek az általános enzimatis reakciókért, a variábilis régió pedig a szekvenciaspecifitás meghatározója. Ennek dacára a szekvenciaspecifitás megváltoztatása a csak a variábilis régiók cseréjével általában sikertelen volt a monospecifikus metiltransferázokkal végzett kísérletekben. Két esetben írtak le olyan kiméra enzimeket, amelyeknél a variábilis régió kicserélésével a szekvenciaspecifitás megváltozott (Klimasauskas et al., 1991), (Mi and Roberts, 1992). A HhaI (Cheng et al., 1993) és HaeIII (Reinisch et al., 1995) metiltransferázok háromdimenziós szerkezeti adatai szintén megerősítették a variábilis régió szekvenciaspecifitást meghatározó szerepét. Az adatokból kiderült, hogy ezek az enzimek egy nagy, és egy kisebb doménből állnak, és a két domén által formált árokban történik a szekvenciaspecifikus DNS kötés. Mindkét esetben a röntgendiffrakciós adatok azt mutatták, hogy a nagy domén tartalmazza a legtöbb konzervált motívumot, és a DNS kis árki felszínével lép kapcsolatba, míg a kis domén alkotásában a variábilis régió és a IX. motívum vesz részt, és a DNS nagy árki felszínével létesít kapcsolatokat. A munkacsoportunkban végzett kísérletek azonban kimutatták, hogy legalábbis két esetben, a SinI (GGWCC) és az EcoRII (CCWGG) enzimek esetén azon képesség, hogy a felismerőszekvencián belüli A/T, illetve G/C bázispárokat megkülönböztessék, a DNS kis árkával létesített interakciók révén valósul meg (Kiss et al., 2001). Ebből a megfigyelésből az következik, hogyha ezen enzimek felépítése hasonló a HhaI, és HaeIII enzimekéhez, a specifitást meghatározó elemek a nagy doménben található. A hipotézist alátámasztják a SinI metiltransferázzal végzett random mutagenézis kísérletek. A mutagenézis során a SinI nagy C-terminális részét mutagenizálták, mely magában foglalja a variábilis régiót is. Két relaxált fenotípusú mutáns enzimet izoláltak (N172S és V173L aminosavcserék), melyek képesek voltak a GGA/TCC

felismerőszekvencia mellett a GGG/CCC szekvenciákat is felismerni és metilálni. A mutációk nem a variábilis régióban helyezkedtek el. Doktori munkám során most a teljes SinI gént mutagenizáltuk, egy új megközelítésben kívántunk új, relaxált specifitású mutánsokat keresni. Kísérleti stratégiánk magában foglalta a SinI gén teljes mutagenezisét, majd *in vitro* random rekombinációját (DNS-keverés), végül az erős szelekció alkalmazását.

VI.1. A mutáns SinI metiltranszferáz izolálása és jellemzése

A random mutagenezis, a DNS-keverés, és az erős szelekció alkalmazásával izoláltunk egy mutáns SinI enzimet, amely a GGWCC szekvenciák mellett a GGSCC szekvenciákat is képes volt nagymértékben metilálni. A mutáns gén kilenc pontmutációt tartalmazott. Öt mutáció (C101T, A130C, T197C, T641C és T685C) aminosavcserét eredményezett (A34V, K44Q, M66T, L214S és Y229H). Egyetlen mutáció sincs a variábilis régióban, három ezek közül az enzim N-terminális részén, az I. konzervált motívum előtt, kettő pedig a molekula belső részén, a VI. és VII. konzervált régiót összekötő részben található (8. ábra). Ahhoz, hogy megállapítsuk, mely mutációk okozzák a megváltozott fenotípust, a mutációs csoportokat szétválasztottuk. Megállapítottuk, hogy a megváltozott szekvensspecifitásért a VI. és VII. régiót összekötő régióban elhelyezkedő mutációk a felelősek, az N-terminális részben található mutációk hozzájárulása a megváltozott fenotípushoz minimális. A csak két belső mutációt (L214S, Y229H) hordozó enzimet közel homogenitásig tisztítottuk, steady-state kinetikai paramétereit meghatároztuk (10. ábra, és 3. táblázat) A mutáns enzim (M.SinI L214S + Y229H) k_{cat}/K_m értéke 4.5-ször alacsonyabb az eredeti GGWCC szubsztráttal, mint a vad típusú enzim hasonló értékei. Ez a változás a k_{cat} érték csökkenésének köszönhető. A mutáns enzim k_{cat}/K_m értéke kb hússzor magasabb volt a GGSCC szubsztráttal, mint a vad típusú enzimé. A mutáns K_m értéke ezzel a szubsztráttal 2-szer magasabb volt, mint a vad típusú enzimé, de k_{cat} értékének 40-szeres növekedése kompenzálta a hiányt.

A DNS metiltranszferázok szekvensspecifitásának megváltoztatása régóta intenzíven kutatott téma. Egy ilyen sikeres, tervezett aminosavcseréken alapuló kísérlet során előállítottak egy olyan EcoRV metiltranszferázt, amely az adenin bázis helyett (GATATC a metilált adenin aláhúzva) a citozint (GCTATC a metilált citozin aláhúzva) metilálta. Igaz ez a változás a katalitikus aktivitás nagymértékű csökkenésével járt (Roth és Jeltsch, 2001). Egy másik sikeres kísérlet során az *in vitro* kompartmentalizációs technika alkalmazásával olyan HaellI mutáns enzimet izoláltak, amely sokkal nagyobb hatékonysággal metilálta az eredeti elsődleges (GGCC), és másodlagos (AGCC) szubsztrátokat, mint a vad típusú enzim (Cohen és mtsai., 2004). A 2000-es évek végén, az random mutagenezist alkalmazó evolúciós és a tervezett fehérjemérnökség technikák

kombinációjával sikerült megváltozott specifitású, a vad típusú enzim általános katalitikus aktivitásával megegyező új típusú enzimeket fejleszteni (Gerasimaite és mtsai., 2009, Chahar és mtsai., 2010). A doktori munkám során bemutatott megváltoztatott szekvenciaspecifitású metiltranszferáz enzim az irodalomból ismert második példa (az első Cohen és mtsai., 2004) a metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatására, az általános katalitikus aktivitás nagyfokú csökkenése nélkül.

VI.2. A mutáns SinI metiltranszferázok nyújtotta védelem egy szabályozható expressziójú GGNC specifikus endonukleázzal szemben

A modifikációs metiltranszferázok feladata a sejtben a gazdasejt DNS-ének megvédeése a saját endonukleázától. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, vajon a korábban (N172S, és V173L), valami a doktori munkám során izolált (A34V, K44Q, M66T, L214S és Y229H) mutáns SinI metiltranszferázok képesek-e védelmet nyújtani a baktériumsejteknek egy olyan endonukleázzal szemben, mely mind a GGWCC, mind a GGSCC helyeket képes hasítani. A munka során egy *in vivo* tesztrendszert használtunk, amely során a baktériumsejtekben a mutáns SinI metiltranszferázokat együtt expresszáltattuk a szabályozható expressziójú GGNC specifikus Sau96I endonukleázzal.

Első lépésként megvizsgáltuk, vajon a mutáns SinI metiltranszferázok képesek-e megvédeni a baktériumsejteket a Sau96I (GGNC) endonukleáztól. A kísérlet során mind a metiltranszferázok, mind az endonukleáz saját promoterének szabályozása alatt állt. Az eredmények azt mutatták, hogy a mutáns metiltranszferázok nem képesek védelmet nyújtani a baktériumsejteknek az endonukleázzal szemben. Megvizsgáltuk, hogy ez letalítás mennyire köthető a GGWCC illetve a GGSCC helyek elégtelen védettségének. A mutáns metiltranszferázokat hordozó plazmidok GGWCC helyei teljesen védettnek tűnnek (11. ábra). Ez a tény azt sugallja, hogy a mutáns metiltranszferázok képesek védelmet nyújtani a SinI endonukleázzal szemben. Az elmélet tesztelésére létrehoztunk egy olyan plazmidot (pSI4-106) mely tartalmazza a SinI endonukleázt, és a V173L aminosavcserét hordozó SinI metiltranszferázt, a plazmidban mindkét gén átírását saját promotere irányítja. A pSI4-106 plazmiddal transzformált baktériumsejtek normális növekedést mutattak, ez pedig azt mutatja, hogy a V173L mutáns metiltranszferáz képes védelmet nyújtani a sejteknek saját endonukleázukkal szemben.

A mutáns SinI metiltranszferázok GGNC specifikus aktivitásának érzékenyebb vizsgálatára kidolgoztunk egy *in vivo* tesztrendszert, amelyben a Sau96I endonukleáz transzkripcióját finoman szabályoztuk. Létrehoztuk a pOB-R.Sau96I (Kan) plazmidot, ahol az

endonukleáz transzkripciója az araBAD promoter irányítása alatt állt. Ebben a konstrukcióban a Sau96I endonukleáz génjének transzkripciója glükózzal represszálható, arabinózzal pedig indukálható. A pOB-R.Sau96I plazmid stabilan fenntartható pSTC-M.Sau96I (Sau96I metiltranszferázt hordoz) plazmid mellett, de Sau96I metiltranszferázt nem hordozó baktériumsejtekben letális, még glükóz jelenlétében is.

DH10B *Escherichia coli* baktériumsejteket transzformáltunk a vad és a mutáns metiltranszferázokat (N172S, V173L, illetve 5 aminosavcserés mutáns), a szabályozható expressziójú endonukleázt tartalmazó (pOB-R.Sau96I), valamint a pJAT13araE plazmidokkal. A pJAT13araE (Gm^R Em^R) plazmidról konstitutívan expresszálódik az arabinóz transzporter. Azért használtuk ezt a plazmidot, hogy a baktériumtenyészet minden egyes sejtjében az arabinózkoncentráció függvényében azonos legyen a transzkripció intenzitása. A különböző (vad és mutáns) metiltranszferázokat hordozó baktériumsejtek életképességét megállapítottuk glükóz, és különböző mennyiségű arabinózt tartalmazó lemezekon. A három plazmidot tartalmazó baktériumsejteket glükóz jelenlétében tápfolyadékra növesztettük, majd különböző hígítású baktériumkultúrákat szélesztettünk 0.01% arabinózt tartalmazó lemezek felületére, és megállapítottuk az élősejtszámot. Ebben a kísérletben az N172S, és a V173L mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképessége ötször magasabb volt, mint a vad, és az 5 aminosavcserés SinI metiltranszferázt hordozó sejtéké (15. ábra), jelezvén, hogy az N172S és V173L mutáns metiltranszferázok nagyfokú védelmet képesek nyújtani a baktériumsejteknek a Sau96I endonukleázzal szemben. Meglepő, hogy az 5 aminosavcserés mutánst hordozó plazmid GGSCC helyeinek metiláltsága hasonló volt a másik két mutánséhoz (11. ábra), az életképességi tesztben nem nyújtott nagyobb védelmet, mint a vad típus. Az N172S és a V173L aminosavcseréket hordozó mutáns metiltranszferázok képesek egy bizonyos szintig védelmet nyújtani *in vivo* egy GGSCC specifikus endonukleázzal szemben. Igaz, az életképességi tesztben az arabinóz tartalmú lemezekon felnőtt kolóniákat továbboltva arabinózt tartalmazó lemezre, vagy tápfolyadékra, nem kaptunk növekedést, hiszen a GGSCC helyek nem tökéletes metiláltsága ebben a kísérletben nem elegendő a sejtek hosszú távú túléléséhez.

VI.3. A DNS ligáz hatása

Az N172S és V173L mutáns metiltranszferázok nyújtotta védelem a Sau96I endonukleázzal szemben meglepő, hiszen ha a plazmidokon levő GGSCC helyek nem teljesen védettek (11. ábra), akkor a kromozómán levő 4218 GGSCC (Pósfai János személyes közlése) egy része is metilálatlan. Feltételeztük, hogy ez a védelem a DNS ligáznak köszönhető, amely képes a Sau96I endonukleáz okozta kettős szálú DNS törések

javítására. Feltételezésünket két korábbi megfigyelés is alátámasztja (Heitman et al., 1989; Smith et al., 1992).

Az elmélet tesztelésére, egy olyan plazmidkonstrukciót használtunk, amely hibrid restriktív-modifikációs rendszert (pMSin-RSau, Ap) tartalmaz, a SinI metiltranszferázt, és a Sau96I endonukleázt. Ennek a plazmidnak egy olyan változatát is elkészítettük, amely a SinI metiltranszferáz V173L mutáns allélját tartalmazza [pMSin(V173L)-RSau]. A pOK-ligA (Kan) plazmid ezekkel kompatibilis, a DNS ligáz gént kódolja, saját promotérének irányítása alatt. A pMSin-RSau, és a pMSin(V173L)-RSau plazmidokat a GGSCC helyek nem tökéletes metiláltsága miatt Sau96I metiltranszferázt hordozó plazmid (pSTC-M.Sau96I) mellett tarthattuk fenn stabilan. A pSTC-M.Sau96I plazmid hőérzékeny replikációs origót tartalmaz, 30°C-on képes replikálódni, míg 42°C-on nem. pMSin-RSau (Ap)/pSTC-M.Sau96I (Cm) plazmidokat tartalmazó ER1398 E. coli baktériumsejteket transzformáltunk pOK-ligA (Kan) plazmiddal, a sejteket 42°C-on inkubáltuk. Sok különböző méretű Ap/Kan kettős rezisztens kolóniát kaptunk, ezek azonban továbboltva friss Ap/Kan tápfolyadékra, vagy lemezre nem voltak életképesek. 1000 transzformánsból csak kettő nőtt fel Ap/Kan tápfolyadékon, ezek a klónok azonban nem tartalmazták a Sau96I endonukleázt. A pMSin(V173L)-RSau, és pOK-ligA plazmidokkal transzformált baktériumsejtek esetén azonban a kettős rezisztens klónok 10%-a életképesen bizonyult, és valóban funkcióképes Sau96I endonukleázt tartalmazott.

Ezek az eredmények, valamint a korábbi megfigyelések egy általános ligáz függő mechanizmust sugallnak, mely képes megmenteni az E. coli sejteket saját endonukleázuktól, minden olyan esetben amikor életképes $r^+ m^-$ klónokat izoláltak. Legjobb tudásunk szerint, minden olyan kísérlet során, ahol életképes $r^+ m^-$ klónokat izoláltak, a restriktív enzim túlnyúló véget eredményezett, amely ellentétben a tompa végekkel szubsztrátja a DNS ligáz enzimnek. Ilyen életképes $r^+ m^-$ klónokat izoláltak a PaeR7I (C/TCGAG) (Gingeras és Brooks, 1983), a TaqI (T/CGA) (Barany, 1987, Slatko és mtsai., 1987) a HaeII (RGC/GC/Y), a HgiAI (GWGCW/C), a HinfI (G/ANTC), a PstI (CTGCA/G), a XbaI (T/CTAGA) (Chandrasegaran és mtsai. 1988, az MwoI (GCNNNNN/NNGC) (Lunnen és mtsai., 1988), a BanIII (AT/CGAT) (Maekawa és Kawakami, 1990), a BstVI (C/TCGAG) (Vasquez és mtsai., 1991), és a PvuI (CGAT/CG) (Smith és mtsai., 1992) restriktív enzimek esetén.

VII. Summary

Type II modification enzymes are ideally suited to studying the molecular mechanisms of sequence-specific protein–DNA interactions as these enzymes are able to recognize, and act upon, 2–8 bp long DNA sequence elements with an astonishing degree of accuracy (Cheng, 1995). The member of one subgroup of these enzymes, the cytosine-C5 methyltransferases (C5-MTases), display a basically similar architecture. Comparison of the amino acid sequences of C5-MTases showed that they share 6 strongly conserved and 4 weakly conserved sequence motifs arranged in every case in the same order [Pósfai et al 1989, Kumar et al, 1994, Figure 2.]. Motifs VIII and IX are separated by a long variable stretch of amino acids with little or no homology between different enzymes. This structure suggested the intuitively attractive assumption that the common motifs might be responsible for the common enzymatic reaction, i.e. the transfer of the methyl group from *S*-adenosyl-L-methionine (AdoMet) to the ring C5 of the target cytosine, whereas the variable region would determine the recognition specificity that distinguishes these enzymes from each other. A subgroup of C5-MTases, the bacteriophage-coded multispecific MTases are able to methylate several different DNA sequences. These enzymes have unusually long variable regions, and segments of these regions (target recognizing domains) were shown to be responsible for the recognition of each of these sequences, as recognition specificity proved to be transferable with the transfer of target recognizing domains to the variable region of another enzyme (Wilke et al, 1988, Balganesch et al, 1987). Although changing sequence specificity by transferring only the variable region has not been reported for any of the monospecific C5-MTases, in two cases chimeric C5-MTases could be constructed whose methylation specificity strongly supported the role of the variable region in the DNA substrate recognition (Klimasauskas et al, 1991; Mi and Roberts, 1992).

The three-dimensional structures of the specific enzyme–DNA complexes of M.HhaI (Cheng et al, 1993) and M.HaeIII (Reinisch et al, 1995) also confirmed the notion that the variable region determines specificity. The structures show that the enzymes consist of a larger and a smaller domain forming a cleft where the substrate DNA fits. In both X-ray models, the large domain containing most of the conserved motifs faces the minor groove of the DNA, whereas the small domain contains the variable region and motif IX faces the major groove. Contacts mediating sequence-specific DNA recognition were shown to occur between the small domain of the MTase and the major groove surface of the DNA. However, experiments from this laboratory have shown that at least in the case of two C5-MTases (M.SinI and M.EcoRII, recognition sequences are GG^A/TCC and CC^A/TGG, respectively) the ability of the enzyme to distinguish between ^A/T and ^G/C base pairs in the middle of the

recognition sequence depends on interaction with the minor groove of the DNA (Kiss et al, 2001). This observation suggested that, if these enzymes have a similar three-dimensional structure to M.HhaI and M.HaeIII, the determining elements must be in the large domain, but not in the variable region. This model was consistent with the results from random mutagenesis of a large segment (including the variable region) of the M.SinI gene. Two mutants with relaxed specificity for the central base pair of the recognition sequence were isolated. None of these mutations was found in the variable region. As in the previous study only the C-terminal two-third of the M.SinI gene was mutagenized, we decided to try a new approach to isolate relaxed specificity mutants of M.SinI. Our experimental strategy involved random mutagenesis of the entire M.SinI gene, followed by „DNA-shuffling” (*in vitro* random recombination), and a strong *in vitro* selection step for the required phenotype.

VII.1 Selection and characterization of the mutant SinI MTase

By a combination of *in vitro* mutagenesis, DNA shuffling and strong selection for the required phenotype, we have isolated a mutant SinI MTase (pTZSmut), which in addition to its canonical substrate sequence GGWCC efficiently methylates also GGSCC sites. DNA sequencing revealed that the mutant gene contained nine point mutations, seven transitions and two transversions. Five mutations (C101T, A130C, T197C, T641C and T685C) resulted in amino acid replacements (A34V, K44Q, M66T, L214S and Y229H). Three of these replacements were located in the N-terminal part, preceding the first conserved structural motif; two replacements were in the middle of the molecule between conserved blocks VI and VII. No substitution was found in the variable region (between blocks VIII and IX). To study their contribution to the altered phenotype, the two groups of mutations were separated. We have found that altered sequence specificity of the mutant enzyme is mainly caused by one or both of the two replacements between motifs VI and VII, and contribution to the phenotype of the three N-terminal mutation was minimal.

The enzyme carrying only the two internal mutations was proved to be soluble and could be purified to near homogeneity (Figure 9). Steady-state kinetic parameters of the double-mutant SinI MTase were determined (Figure 10 and Table 3). M.SinI(L214S + Y229H) has a 4.5-fold lower k_{cat}/K_m value for the canonical substrate GGWCC than the WT enzyme. This change is mainly due to the decrease in k_{cat} . The mutant has 2-fold higher K_m than the WT enzyme for the GGSCC substrate, however, this loss is more than compensated by the large (40-fold) increase in k_{cat} .

Changing recognition specificity of modification methylases by various techniques of protein engineering has long been a desirable goal of several groups working in this field. In one successful attempt, rational protein design was used to change the target base

preference of M.EcoRV from adenine to cytosine. However, this change in specificity was accompanied by a large decrease in overall catalytic activity (Roth and Jeltsch, 2001). Other authors successfully employed a directed *in vitro* evolution technique (*in vitro* compartmentalisation) to achieve a change in the specificity of the HaeIII MTase. The catalytic efficiency of the mutant enzyme was better than that of the WT enzyme with the principal substrate (Cohen et al, 2004).

To the best of our knowledge, our results represent the second example of a change in recognition specificity without significant impairment of activity. The success of achieving a change in substrate specificity using *in vitro* evolution provides new ammunition for those arguing for the superiority of random, over 'designed' approaches.

VII.2 *In vivo* DNA protection by relaxed-specificity SinI DNA methyltransferase variants

The role of the modification MTase is to protect the host DNA from the cognate restriction endonuclease. In this work we tested the level of protection provided by the M.SinI mutants against a restriction enzyme cleaving both GGWCC and GGSCC sites. We used an *in vivo* system in which the mutant MTases were coexpressed with the GGNCC-specific Sau96I endonuclease, whose expression could be tightly controlled, and viability of the cells was quantitatively estimated.

First we tested the ability of the mutant enzymes to function as the counterpart of a GGNCC-specific restriction endonuclease. In this experiment the endonuclease (Sau96I) and the mutant methyltransferases were expressed from their native promoter. These results showed that the mutant SinI MTases could not protect the cell DNA from Sau96I endonuclease *in vivo*. GGWCC-specific methylation of the mutant plasmids seemed to be complete (Figure 11), suggesting that the mutant enzymes can protect the host DNA against the SinI endonuclease *in vivo*. To test this assumption, a plasmid (pSI4-106) which contains the SinI REase and SinI MTase genes in their native arrangement but in which the MTase gene has the V173L mutation was constructed. DH10B cells harboring this plasmid had a normal growth rate. These data indicated that M.SinI (V173L), and most probably also the N172S and the 5mut variants, preserved the capacity to function as a genuine GGWCC-specific modification MTase, but their acquired GGSCC-specific activity was too low to protect the cell against a GGNCC-specific restriction endonuclease.

To test the GGNCC-specific activity of the mutant SinI MTases *in vivo* in a more controlled manner, a system in which expression of the Sau96I endonuclease can be tightly regulated was designed. A plasmid (pOB-RSau96I) expressing R.Sau96I under the control of the *araBAD* promoter was constructed. Transcription of the Sau96I REase gene in pOB-RSau96I can be repressed by adding glucose or induced by adding arabinose to the medium.

pOB-RSau96I is stable in cells containing pSTC-MSau96I, which expresses the Sau96I MTase, but is lethal in m^- cells even in the presence of glucose.

To assess the viability of cells coexpressing the mutant MTases and Sau96I endonuclease, *E. coli* DH10B cells were transformed with three plasmids: pJAT13araE, pSin5 or its mutant derivatives, and pOB-RSau96I. Plasmid pJAT13araE (Gm^R Em^R), which constitutively expresses an arabinose transporter protein and is compatible with both ColE1 and p15A replicons, was used to ensure uniform expression of R.Sau96I in all cells of the culture.

Viability was tested by plating aliquots of cultures grown in the presence of glucose onto agar plates containing glucose or different concentrations of arabinose. Viability was quantitatively assessed by determining plating efficiency at 0.01% arabinose as described in Materials and Methods. At this arabinose concentration, the plating efficiency of cells producing the N172S or V173L mutant MTases was approximately fivefold higher than that of cells producing the WT or the 5mut enzyme (Figure 15), indicating that the N172S and V173L mutants of M.SinI can provide significant protection against Sau96I cleavage *in vivo*. Interestingly, although the methylation level of GGSCC sites in pSin10-5mut was not dramatically lower than that in the two single mutants (Figure 11), the clone producing the variant with five substitutions displayed no increase in plating efficiency relative to the WT (Figure 15). This suggests that there is a minimum level of methylation which is essential to have a detectable effect on viability under the conditions of the plating assay.

The experiments described above demonstrated that the N172S and V173L mutant SinI MTases provide significant protection *in vivo* against a restriction endonuclease with GGNCC specificity. However, when the colonies obtained on the arabinose-containing plates were transferred onto fresh arabinose-containing plates, they usually did not grow, indicating that the level of methylation at GGSCC sites was insufficient to support long-term survival. To further test the viability of cells in colonies appearing on arabinose-containing plates, colonies taken from arabinose-containing as well as glucose-containing plates were suspended and replated on glucose-containing plates. These tests revealed that for both N172S and V173L, colonies that appeared on arabinose-containing plates contained approximately 10- to 100-fold fewer viable cells than colonies taken from glucose-containing plates.

VII.3 Effect of elevated level of DNA ligase

At first glance, even the limited protection provided by the N172S and V173L mutants seems surprising, as methylation of the GGSCC sites in the plasmid DNA, and presumably in the genomic DNA, was not complete (Figure 11), probably leaving many of the 4218 GGSCC

sites in the *E. coli* genome (J. Pósfai, personal communication) unprotected. We assumed that viability under these conditions was due to DNA ligase-mediated repair of Sau96I endonuclease-inflicted DNA scissions. This model was suggested by two previous observations (Heitman et al, 1989; Smith et al, 1992). To test the hypothesis that DNA ligase can repair DNA scissions occurring at incompletely modified GGSCC sites, two plasmids encoding SinI-Sau96I hybrid R-M systems [pMSin-RSau and pMSin(V173L)-RSau] and a compatible plasmid (pOK-ligA) encoding *E. coli* DNA ligase were constructed. pMSin-RSau carries the WT SinI MTase and the Sau96I REase genes, whereas pMSin(V173L)-RSau carries the V173L mutant allele of the SinI MTase gene and the Sau96I REase gene (Figure 16; Table 5). Because of unprotected GGSCC sites, these plasmids can be maintained only in cells containing the Sau96I MTase gene on a compatible plasmid. When plasmid preparations containing pMSin-RSau and pSTC-MSau96I were used to transform ER1398 (pOK-ligA) cells at 42°C, a temperature nonpermissive for pSTC-MSau96I, Ap^RKn^R colonies of various sizes were obtained. Of 1,000 Ap^RKn^RCm^S transformants, only two grew when transferred onto fresh Ap-Kn plates or inoculated into LB-Ap-Kn liquid medium. Analysis of these two clones revealed that they did not contain Sau96I endonuclease. In contrast, when ER1398(pOK-ligA) cells were transformed with the same plasmid preparation [pMSin(V173L)-RSau/pSTC-MSau96I], approximately 10% of the 200 Ap^RKn^RCm^S clones tested were stable enough to grow up to high density in a liquid culture. Digestion of plasmid DNA purified from these clones showed the characteristic partial fragmentation pattern with Cfr13I, and cell extracts prepared from the clones contained Sau96I endonuclease, proving that the increased viability was not due to the presence of the Sau96I MTase or the absence of the Sau96I endonuclease.

These results and previous observations suggest the generalization that the same mechanism (ligase-mediated repair) saved *E. coli* cells from self-destruction in all cases where the puzzling phenomenon of viable r⁺ m⁻ clones was observed. In this context, it is worth to call attention to the so-far-perhaps-unrecognized fact that, to our knowledge, in all R-M systems where viable r⁺ m⁻ clones have been reported, the restriction enzyme produces cohesive ends, which (unlike blunt ends) are substrates for *E. coli* DNA ligase: PaeR7I (C/TCGAG) (Gingeras and Brooks, 1983), TaqI (T/CGA) (Barany, 1987, Slatko et al, 1987), HaeII (RGCGC/Y), HgiAI (GWGCW/C), HinfI (G/ANTC), PstI (CTGCA/G), XbaI (T/CTAGA) (Chandrasegaran et al, 1988), MwoI (GCNNNNN/NGC) (Lunnen et al, 1988), BanIII (AT/CGAT) (Maekawa and Kawakami, 1990), BstVI (C/TCGAG) (Vasquez et al, 1991), and PvuI (CGAT/CG) (Smith et al, 1992). Moreover, the restriction enzymes cloned by the "endo-blue method," which is based on the expression of the restriction endonuclease in cells whose DNA is unprotected or is only partially protected by methylation, belong to the type

making overhanging ends: TaqI, Tth111I (GACN/NGTC), and BsoBI (C/YCGRG) (Fomenkov et al, 1994, Ruan et al, 1996).

VIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Venetianer Pálnak, aki megszeretette velem a DNS metiltranszferázokat, és a random evolúciós technikákat. Köszönöm, hogy mindig volt egy jó tanácsa, egy új ötlete, és köszönöm a bátorító légkört, ahol dolgozhattam.

Köszönöm Kiss Antalnak a munka során nyújtott rengeteg segítségét, tanácsait. Köszönet illeti a dolgozat készítése során szakmai segítségéért, és türelméért is.

Köszönöm Groma Gergelynek a mutáns metiltranszferázok tisztításában és kinetikai jellemzőinek meghatározásában végzett munkáját.

Köszönöm Magyaródi Erzsébetnek a kísérletek során nyújtott technikai segítségét, áldozatos munkáját.

IX. Irodalmi hivatkozások

- d'Abbadie M, Hofreiter M, Vaisman A, Loakes D, Gasparutto D, Cadet J, Woodgate R, Pääbo S, Holliger P. (2007) Molecular breeding of polymerases for amplification of ancient DNA. *Nat Biotechnol.* **8**:939-43.
- Antikainen, N.M., and Martin, S.F. (2005) Altering protein specificity: techniques and applications. *Bioorg Med Chem* **13**: 2701-2716.
- Arber, W. (2000) Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 1-7.
- Balganesh, T.S., Reiners, L., Lauster, R., Noyer-Weidner, M., Wilke, K., and Trautner, T.A. (1987) Construction and use of chimeric SPR/phi3T DNA methyltransferases in the definition of sequence recognizing enzyme regions. *EMBO J.* **6**: 3543-3549.
- Barany, F. (1987) A genetic system for isolation and characterization of TaqI restriction endonuclease mutants. *Gene* **56**: 13-27.
- Bitinaite, J.B., Klimasauskas, S.J., Butkus, V.V., and Janulaitis, A.A. (1985) Characterization of restriction-modification enzymes Cfr13 I from *Citrobacter freundii* RFL13. *FEBS Lett* **182**: 509-513.
- Black, M. E., Newcomb, T. G., Wilson, H. M. P. and Loeb, L. A. (1996) Creation of drug-specific herpes simplex virus type 1 thymidine kinase mutants for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3525-3529
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Buchholz, F., Angrand, P.O., and Stewart, A.F. (1998) Improved properties of FLP recombinase evolved by cycling mutagenesis. *Nat Biotechnol* **16**: 657-662.
- Chahar S, Elsayy H, Ragozin S, Jeltsch A (2010) Changing the DNA recognition specificity of the EcoDam DNA-(adenine-N6)-methyltransferase by directed evolution. *J Mol Biol.* **395**(1):79-88.
- Chandrasegaran, S., Lunnen, K.D., Smith, H.O., and Wilson, G.G. (1988) Cloning and sequencing the HinfI restriction and modification genes. *Gene* **70**: 387-392.
- Chen, L., MacMillan, A.M., Chang, W., Ezaz-Nikpay, K., Lane, W.S., and Verdine, G.L. (1991) Direct identification of the active-site nucleophile in a DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Biochemistry* **30**: 11018-11025.
- Cheng, X., Kumar, S., Klimasauskas, S., and Roberts, R.J. (1993) Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **58**: 331-338.
- Cohen, H.M., Tawfik, D.S., and Griffiths, A.D. (2004) Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using *in vitro* compartmentalization. *Prot. Eng. Des. Sel.* **17**: 3-11.
- Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288-291.
- Fomenkov, A., Xiao, J.P., Dila, D., Raleigh, E., and Xu, S.Y. (1994) The 'endo-blue method' for direct cloning of restriction endonuclease genes in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **22**: 2399-2403.
- Gerasimaite R, Vilkaitis G, Klimasauskas S. (2009) A directed evolution design of a GCG-specific DNA hemimethylase. *Nucleic Acids Res* **37**(21):7332-41.
- Gingeras, T.R., and Brooks, J.E. (1983) Cloned restriction/modification system from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**: 402-406.
- Gong, W., O'Gara, M., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. (1997) Structure of pvu II DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucleic Acids Res* **25**: 2702-2715.

- Gottesman, M.M., Hicks, M.L., and Gellert, M. (1973) Genetics and function of DNA ligase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **77**: 531-547.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R., and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4645-4649.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- Haring, V., Scholz, P., Scherzinger, E., Frey, J., Derbyshire, K., Hatfull, G., Willetts, N.S., and Bagdasarian, M. (1985) Protein RepC is involved in copy number control of the broad host range plasmid RSF1010. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6090-6094.
- Heitman, J., Zinder, N.D., and Model, P. (1989) Repair of the *Escherichia coli* chromosome after *in vivo* scission by the EcoRI endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2281-2285.
- Hengen, P.N. (1995) Methods and reagents. Electro-transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Trends Biochem Sci* **20**: 248-249.
- Heusipp, G., Falker, S., and Schmidt, M.A. (2007) DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *Int J Med Microbiol* **297**: 1-7.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., and Nakata, A. (1986) Nucleotide sequence of the lig gene and primary structure of DNA ligase of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **204**: 1-7.
- Jeltsch, A., Christ, F., Fatemi, M., and Roth, M. (1999) On the substrate specificity of DNA methyltransferases. adenine-N6 DNA methyltransferases also modify cytosine residues at position N4. *J Biol Chem* **274**: 19538-19544.
- Jeltsch, A. (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem* **3**: 274-293.
- Karreman, C., and de Waard, A. (1988) Cloning and complete nucleotide sequences of the type II restriction-modification genes of *Salmonella infantis*. *J. Bacteriol.* **170**: 2527-2532.
- Khlebnikov, A., Datsenko, K.A., Skaug, T., Wanner, B.L., and Keasling, J.D. (2001) Homogeneous expression of the PBAD promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* **147**: 3241-3247.
- Kiss, A., Pósfai, G., Zsurka, G., Raskó, T., and Venetianer, P. (2001) Role of DNA minor groove interactions in substrate recognition by the M.SinI and M.EcoRII DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3188-3194.
- Klimasauskas, S., Nelson, J.L., and Roberts, R.J. (1991) The sequence specificity domain of cytosine-C5 methylases. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6183-6190.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J., and Cheng, X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**: 357-369.
- Kobayashi, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* **29**: 3742-3756.
- Kuchner, O., and Arnold, F.H. (1997) Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends Biotechnol* **15**: 523-530.
- Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Posfai, J., Roberts, R.J., and Wilson, G.G. (1994) The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* **22**: 1-10.
- Labahn, J., Granzin, J., Schluckebier, G., Robinson, D.P., Jack, W.E., Schildkraut, I., and Saenger, W. (1994) Three-dimensional structure of the adenine-specific DNA methyltransferase M.Taq I in complex with the cofactor S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10957-10961.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laos R, Thomson JM, Benner SA. (2014) DNA polymerases engineered by directed evolution to incorporate non-standard nucleotides. *Front Microbiol.*;5:565.

- Lederberg, E.M., and Cohen, S.N. (1974) Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* **119**: 1072-1074.
- Liao, H., McKenzie, T. and Hageman, I.K. (1986) Isolation of a thermostable enzyme variant by cloning and selection in a thermophile *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**, 576-580
- Lukacsovich, T., Orosz, A., Baliko, G., and Venetianer, P. (1990) A family of expression vectors based on the *rrnB* P2 promoter of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* **16**: 49-55.
- Lunnen, K.D., Morgan, R.D., Timan, C.J., Krzycki, J.A., Reeve, J.N., and Wilson, G.G. (1989) Characterization and cloning of *MwoI* (GCN7GC), a new type-II restriction-modification system from *Methanobacterium wolfei*. *Gene* **77**: 11-19.
- Maekawa, Y., and Kawakami, B. (1990) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *BanI* and *BanIII* restriction-modification systems from *Bacillus aneurinolyticus*. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 195-198.
- Messer, W., and Noyer-Weidner, M. (1988) Timing and targeting: the biological functions of *Dam* methylation in *E. coli*. *Cell* **54**: 735-737.
- Mi, S., and Roberts, R.J. (1992) How *M.Spl* and *M.HpaII* decide which base to methylate. *Nucleic Acids Res* **20**: 4811-4816.
- Miner, Z., Schlagman, S.L., and Hattman, S. (1989) Single amino acid changes that alter the DNA sequence specificity of the DNA-[N6-adenine]methyltransferase (*Dam*) of bacteriophage T4. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8149-8157.
- Palmer, B.R., and Marinus, M.G. (1994) The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*--a review. *Gene* **143**: 1-12.
- Pósfai, G., Koob, M.D., Kirkpatrick, H.A., and Blattner, F.R. (1997) Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island *LEE* of the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J. Bacteriol.* **179**: 4426-4428.
- Pósfai, J., Bhagwat, A.S., Pósfai, G., and Roberts, R.J. (1989) Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **17**: 2421-2435.
- Raleigh, E.A., and Wilson, G. (1986) *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 9070-9074.
- Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L., and Lipscomb, W.N. (1995) The crystal structure of *HaeIII* methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* **82**: 143-153.
- Reisenauer, A., Kahng, L.S., McCollum, S., and Shapiro, L. (1999) Bacterial DNA methylation: a cell cycle regulator? *J Bacteriol* **181**: 5135-5139.
- Renbaum P, Razin A. (1995) Footprint analysis of *M.SssI* and *M.HhaI* methyltransferases reveals extensive interactions with the substrate DNA backbone. *J Mol Biol.* **248**(1):19-26.
- Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., Blumenthal, R.M., Degtyarev, S., Dryden, D.T., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E.S., Gumport, R.I., Halford, S.E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D.P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T.R., Kobayashi, I., Kong, H., Kruger, D.H., Lacks, S., Marinus, M.G., Miyahara, M., Morgan, R.D., Murray, N.E., Nagaraja, V., Piekarowicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D.N., Reich, N., Repin, V.E., Selker, E.U., Shaw, P.C., Stein, D.C., Stoddard, B.L., Szybalski, W., Trautner, T.A., Van Etten, J.L., Vitor, J.M., Wilson, G.G., and Xu, S.Y. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **31**: 1805-1812.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Pósfai, J., and Macelis, D. (2007) REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res* **35**: D269-270.
- Roth, M., and Jeltsch, A. (2001) Changing the target base specificity of the *EcoRV* DNA methyltransferase by rational *de novo* protein-design. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3137-3144.
- Ruan, H., Lunnen, K.D., Scott, M.E., Moran, L.S., Slatko, B.E., Pelletier, J.J., Hess, E.J., Benner, J., 2nd, Wilson, G.G., and Xu, S.Y. (1996) Cloning and sequence

- comparison of Aval and BsoBI restriction-modification systems. *Mol. Gen. Genet.* **252**: 695-699.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Slatko, B.E., Benner, J.S., Jager-Quinton, T., Moran, L.S., Simcox, T.G., Van Cott, E.M., and Wilson, G.G. (1987) Cloning, sequencing and expression of the TaqI restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.* **15**: 9781-9796.
- Smith, M.D., Longo, M., Gerard, G.F., and Chatterjee, D.K. (1992) Cloning and characterization of genes for the PvuI restriction and modification system. *Nucleic Acids Res.* **20**: 5743-5747.
- Spee, H.J., deVos, W.M., and Kuipers, O.P. (1993) Efficient random mutagenesis method with adjustable mutation frequency by use of PCR and dITP. *Nucleic Acids Res* **21**: 777-778.
- Stemmer, W.P. (1994) Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature* **370**: 389-391.
- Szilák, L., Venetianer, P., and Kiss, A. (1990) Cloning and nucleotide sequence of the genes coding for the Sau96I restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4659-4664.
- Tao, H., and Cornish, V.W. (2002) Milestones in directed enzyme evolution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 858-864.
- Vasquez, C., Saavedra, C., and Gonzalez, E. (1991) Cloning the BstVI restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Gene* **102**: 83-85.
- Vieira, J., and Messing, J. (1991) New pUC-derived cloning vectors with different selectable markers and DNA replication origins. *Gene* **100**: 189-194.
- Wang HH, Isaacs FJ, Carr PA, Sun ZZ, Xu G, Forest CR, Church GM.(2009) Programming cells by multiplex genome engineering and accelerated evolution. *Nature*.; **460**(7257):894-8.
- Wang Y, Prosen DE, Mei L, Sullivan JC, Finney M, Vander and Horn PB.(2004) A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro *Nucleic Acids Res.*; **32**(3):1197-207.
- Wilke, K., Rauhut, E., Noyer-Weidner, M., Lauster, R., Pawlek, B., Behrens, B., and Trautner, T.A. (1988) Sequential order of target-recognizing domains in multispecific DNA-methyltransferases. *EMBO J.* **7**: 2601-2609.
- Wilson, G.G., and Murray, N.E. (1991) Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* **25**: 585-627.
- You, L. and Arnold, F. H. (1996) Directed evolution of subtilisin E in *Bacillus subtilis* to enhance total activity in aqueous dimethylformamide. *Protein Eng.* **9**: 77-83
- Zhang YX, Perry K, Vinci VA, Powell K, Stemmer WP, del Cardayré SB. (2002) Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria. *Nature.* **415**(6872):644-6.
- Zhao, H., and Arnold, F.H. (1997) Optimization of DNA shuffling for high fidelity recombination. *Nucleic Acids Res* **25**: 1307-1308.