

**C5-citozin metiltranszferázok
szekvenciaspecifikus DNS felismerésének
vizsgálata**

Egyetemi doktori (Ph.D.) disszertáció

Készítette: Raskó Tamás

Témavezető: Kiss Antal

MTA Szegedi Biológiai Központ, 2003

Előszó

A prokarióta DNS C5-citozin metiltranszferázok (C5-MTázok) nagyon jó kísérleti modelljei a szekvenciaspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatásnak. Az irántuk megnyílvánuló érdeklődés abból is származik, hogy működési mechanizmusukban, szerkezetükben hasonlóságot mutatnak eukarióta társaikhoz. A DNS metiláció az eukarióta élőlényekben a számos fontos biológiai folyamat mellett a génszabályozásban is szerepet játszik. A prokarióta metilázok tanulmányozásán keresztül ezért közelebb juthatunk az eukarióta C5-MTázok biológiai szerepének megismeréséhez is.

A disszertáció első része prokarióta C5-citozin metiltranszferázok működése során fellépő jelenséggel, az enzimek által kiváltott DNS görbítés vizsgálatával foglalkozik. A DNS görbítés számos a DNS-t szekvenciaspecifikusan felismerő fehérje sajátja. A már önmagában is érdekes jelenség tanulmányozása azonban olyan más alapvető kérdésekre is megadhatja a választ, mint például, a vizsgált fehérje DNS hajlítása hogyan járul hozzá a szekvenciaspecifikus DNS felismeréshez. A vizsgálatok kezdetén kizárólag a *BspRI* metiltranszferáz DNS görbítését akartuk tanulmányozni, viszont az első eredmények számos e témában született dolgozatnak mondtak ellent. Ezért döntöttünk úgy, hogy további enzimeket is bevonunk a vizsgálataink sorába, annak érdekében, hogy megerősítsük vagy megcáfoljuk a kapott eredményeinket.

A dolgozat második része egy CG-specifikus C5-MTáz, az *M.SssI* biotechnológiai célú felhasználásával kapcsolatos eredményeinket foglalja össze. Csoportunk 2001-ben egy nemzetközi konzorcium tagjaként elnyerte az Európai Unió 5.Kutatási Keretprogramjának támogatását. A projekt célja olyan C5-MTáz létrehozása, amelynek specifikitását részben a hozzá kovalens kötéssel kapcsolt oligonukleotid, illetve peptid nukleinsav (PNA) határozza meg. E

munkán belül csoportunk feladata, hogy olyan M.SssI enzimvariánsokat állítsunk elő, amelyek alkalmasak oligonukleotidhoz (ODN), vagy egy peptid nukleinsavhoz (PNA) való konjugációra. A variánsok előállítása során a számos probléma felmerülése végett több konstrukciót is létrehoztunk. Ezen variánsok egy része megfelelt a dolgozatban később említett követelményeknek, másrészük viszont nem. Éppen a munka jellegéből adódóan ez a rész egyfajta "próbálkozások" sorozatának leírása, amely során számos igen érdekes jellemvonást tártunk fel az SssI metiltranszferáz klónozása és túltermeltetése vonatkozásában.

Természetesen az SssI metiltranszferáz variánsok létrehozása közben a kívánt kritériumokat próbáltuk szem előtt tartani, de a meglévő fúziós metilázok nagy mennyiségben történő, homogenitásig való tisztítása felveti annak a lehetőségét is, hogy az SssI metiltranszferázt kristályosítani lehessen. Megismerve majd a fehérje háromdimenziós térszerkezetét talán közelebb kerülhetnénk az azonos specifitású humán C5-citozin metiltranszferáz működésének megismeréséhez is.

Az SssI MTázzal kapott eredmények egy része Slaska-Kiss Krystyna munkájából származik.

Irodalmi áttekintés

A DNS metiláció jelentősége

Számos élőlény DNS-ében a négy közismert bázison kívül találhatunk módosított bázisokat, amelyek az adenin és a citozin metilált származékai. A metilált bázisok a DNS replikációját követően keletkeznek. A metilációt a DNS-metiltranszferázok végzik, melyek többsége szekvenciaspecifikus enzim, azaz a DNS-t csak bizonyos, az enzimre jellemző nukleotidsorrendnél metilálják. A metiláció végeredménye N6-metiladenin, N4-metilcitozin és C5-metilcitozin lehet. A reakcióban felhasznált metildonor az S-adenozil-L-metionin (SAM). A DNS-metiláció nincs hatással a Watson-Crick bázispárosodás kialakulására. A metilcsoport mindhárom metilált bázis esetében a DNS nagy árkában helyezkedik el, így a DNS-kötő fehérjék számára könnyen felismerhető.

A prokarióta élőlényekben a DNS metiláció számos fontos biológiai funkcióban játszik szerepet, így: 1, különbségtétel a saját és a nem saját örökítőanyag között; 2, a posztreplikatív javítómechanizmus irányítása; 3, a sejtciklus és benne a DNS replikáció szabályozása.

A saját és a nem saját örökítőanyag közti különbség felismerését a restriktációs-modifikációs rendszerek végzik, amelyek, mint egy "bakteriális immunrendszer" képesek a sejtet a külső DNS, például fág fertőzés behatolása ellen megvédeni. Az eddig vizsgált baktériumok mintegy negyedében találtak egy vagy több restriktációs-modifikációs rendszert, így mára már több mint 3000 ilyen rendszerről van ismeretünk. A modifikációs metiltranszferázok biológiai szerepe a sejt saját DNS-ének védelme az azonos szekvenciát felismerő restriktációs endonukleáz hasításával szemben. A nem restriktációs-modifikációs rendszerhez tartozó szekvenciaspecifikus *Escherichia coli* Dam metiltranszferáz jelentős szerepet tölt be a DNS-mismatch-repair, a kromoszómareplikáció és

szegregáció, a plazmidreplikáció, a transzpozíció és a génkifejeződés szabályozásában (Messer és Noyer-Weidner, 1988).

Az emlős, illetve a növényi genomikus DNS szekvenciák nagy százalékban tartalmaznak C5-metilált citozint. Ezen szekvenciák *E.coli* sejtekbe való bejuttatását nagy mértékben hátráltatják 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 restrikciós emésztéssel eliminálják.

Az eukariótákban csak C5-citozin metiltranszferázokat találunk. Emlősökben a CG szekvenciák közel 60-90%-a metilált, amely a genomiális DNS citozin tartalmának 3-8%-át teszi ki. Prokariótákban a DNS szekvencia önmagában meghatározza a metiláció helyét, eukariótákban metilált és nem metilált CG dinukleotidok léteznek. A citozin metiláció a DNS mindkét szálát érinti. A replikációban keletkezett DNS szál metilálásáért a "fenntartó" metiltranszferázok a felelősek, amelyek kizárólag hemimetilált DNS-n működnek. A metilációs mintázat így a sejtosztódások során változások nélkül fennmarad. Az eukarióta szervezetekben a citozin metilációnak számos biológiai folyamatban van kulcsszerepe, így például a génkifejeződés szabályozásában. A promóter régiók metilálása általában az adott gén átíródásának a csökkenését, illetve annak kikapcsolását eredményezheti. Ez a szabályozás különböző folyamatok eredményeképpen következhet be. Számos transzkripciós faktorról, mint az AP-2, cMyc/Myn, E2F, NF κ B tudjuk, hogy képtelen a metilált DNS szekvenciához kötődni, így kifejtteni biológiai hatását. Léteznek viszont olyan fehérjék, amelyek az 5'-metil-citozinhoz való erőteljes kötődésükkel egy transzkripciós gátat hoznak létre a metilált DNS szakaszon, ezáltal megakadályozzák a génátírás folyamatát. A metiláció a kromatint alkotó hisztonfehérjék deacetilációját is előidézheti, amely folyamat a kromatin kondenzálódásához, ennek eredményeképpen pedig stabil génrepresszióhoz vezet. A DNS metiláció hatása még számos érdekes biológiai folyamatban

megmutatkozik. Így említhetjük az X kromoszóma inaktiválásában (Gartler és Riggs, 1983), a genomikus bevésoedésben (imprinting) (Li és mtsai., 1993, Efstratiadis, 1994), az egyedfejlődés szabályozásában (Li és mtsai., 1992) játszott szerepet. Egérben a citozin metiltranszferáz működése esszenciálisnak bizonyult, hiszen a mutáns, működésképtelen metiltranszferázt termelő egérembriók a fejlődés meghatározott szakaszában elpusztultak (Li és mtsai., 1992).

Jól ismert, hogy a C5-metilcitozin spontán deaminálódással timinné alakulhat. Ez az esemény a citozin deaminálódásához képest könnyebben végbemegy. Mivel a reakció során egy, a DNS-ben természetes körülmények között előforduló bázis keletkezik, ezért a sejtek DNS-hibajavítórendszere nem képes a mutációt felismerni. Így a C5-metilcitozin mind prokariótákban, mind eukariótákban fontos mutációforrás (Rideout és mtsai., 1990, Oberlé és mtsai., 1991).

Az utóbbi néhány év derített fényt arra, hogy mind az emberi genomban, mind növényekben, egerekben a transzpozonok és a különböző repetitív szekvenciák metiláltsága kulcsszerepet tölt be a genetikai állomány stabilitásának fenntartásában (Yoder és mtsai., 1997). A CG felismerőhelyben gazdag transzpozonok és más repetitív szekvenciák metiláltsági állapota rendkívül magas (Smit, 1999), amelynek kismértékű megváltozása is ezen elemek újbóli mozgását idézi elő mind egerekben, mind növényekben (Walsh és mtsai, 1998; Jackson-Grusby és mtsai., 2001; Chen és mtsai 1998; Miura és mtsai., 2001).

A II. típusú metiltranszferázok

A II. típusú restrikciós-modifikációs rendszerbe tartozó metiltranszferázokat három csoportba oszthatjuk aszerint, hogy milyen bázist metilálnak és mi a reakció végterméke. Így megkülönböztetünk N6-adenin, N4-

citozin, C5-citozin metiltranszferázokat. Mostanára több mint száz II. típusú metiltranszferáz génjét sikerült klónozni és a legtöbb klónozott metiláznak az aminosavszekvenciája is ismert.

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 szekvenciahomológiát találunk. A C5-MTázok tíz konzervált blokkot tartalmaznak, amelyek majdnem mindig azonos sorrendben minden C5-MTázban 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).

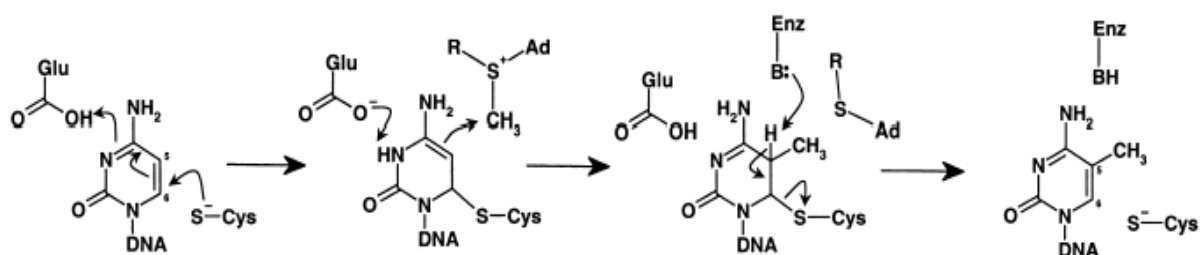
Az első konzervatív motívum nemcsak a II. típusú metiltranszferázoknál, hanem valamennyi olyan metiltranszferáznál megtalálható, amely metildonorként S-adenozil-metionint (SAM) használ (Lauster, 1989; Klimasauskas és mtsai., 1989). Valószínűleg az itt található aminosavak a metildonor kötésében játszanak szerepet (Kagan és Clarke, 1994). Ezt alátámaszják a *HhaI*, a *TaqI* és a *PvuII* metiltranszferázok röntgendiffrakciós szerkezeti modelljei is, amelyekben ez a fehérjerészlet a SAM-kötő zseb része (Cheng és mtsai., 1993; Labahn és mtsai., 1994; Gong és mtsai., 1997).

A metiltranszferázok *in vivo* szubsztrátja a DNS replikációja során keletkező hemimetilált DNS. A II. típusú restriktációs-modifikációs rendszerbe tartozó metiltranszferázok többnyire monomerként működő enzimek és közös sajátosságuk, 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 C5-citozin metiltranszferázok

Jelenleg több, mint hatvan C5-citozin metiltranszferáz aminosavszekvenciáját ismerjük (Roberts és mtsai., 2003). Ezeknek a szekvenciáknak az összehasonlításából kiderült, hogy a C5-citozin-metiltranszferázok között jelentős hasonlóság van. A hasonlóságok főleg a már említett tíz konzervált blokkra lokalizálhatók. A VIII. és a IX. blokk között található egy hosszabb szakasz, az ún. variábilis régió. Ez a rész felelős a szekvenciaspecifikus DNS-felismerésért (Kumar és mtsai., 1994). A C5-MTázok katalitikus mechanizmusa elég jól ismert. A IV. blokkban, a szigorúan konzervált PC motívumban található cisztein kulcsszerepet játszik a metilációs reakcióban. Ennek az aminosavnak a kénje nukleofil támadást intéz a metilálandó citozin pirimidin gyűrűjének 6-os szénatomja ellen. A reakció során egy kovalens DNS-fehérje komplex képződik. A nukleofil támadás hatására a citozin 5-ös szénatomján lokális negatív töltés keletkezik, ami lehetővé teszi a SAM-metildonorról a metilkation átkerülését az 5-ös szénatomra. A metiláció befejezésével az enzim-DNS-komplex β -eliminációval bomlik fel (Wu és Santi, 1987) (1.ábra). Az reakció termékei az S-adenozil-L-homocisztein (SAH) és a metilált bázist tartalmazó DNS. A metilációs folyamat során kialakuló kovalens fehérje-DNS intermediert Chen és munkatársai izolálták, az első konkrét kísérleti bizonyítékát adva ezzel az addig főleg enzimkinetikai vizsgálatok eredményei alapján feltételezett mechanizmusnak (Chen és mtsai., 1991).



1. ábra: A C5-citozin metiltranszferázok katalitikus mechanizmusa.

A C5-citozin-metiltranszferázok működésének vizsgálatában, a reakciómechanizmus megismerésében nagyon fontos szerepet játszottak az 5-fluorocitozinnal, mint citozinanalóggal végzett kísérletek. A metilálendő bázis helyén 5-fluorocitozint tartalmazó DNS-sel a C5-citozin metiltranszferázok SAM jelenlétében stabil kovalens komplexet képeznek. Ez a komplex a metilációs reakció egyik intermediere, amelyben az enzim a katalitikus nukleofil ciszteinen keresztül kovalensen kötődik a citozin pirimidingyűrűjében levő 6-os szénatomhoz. A komplex kialakulása után a SAM-ról a metilcsoport átkerül a pirimidingyűrű 5-ös szénatomjára. A metiltranszfert követő β -elimináció a fluor nagy elektronegativitása miatt nem tud végbemenni, a reakció e lépés előtt megakad. Az 5-fluorocitozint tartalmazó DNS-szubsztrát segítségével sikerült a katalitikus cisztein és a metilálendő citozin között kialakuló kovalens intermedier létét igazolni.

C5-citozin-metiltranszferázok röntgendiffrakciós modelljei

A C5-citozin metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megismerésében és a metilációs reakció mechanizmusának tisztázásában legtöbb ismeretünk két enzim DNS-sel alkotott felismerőkomplexének röntgendiffrakciós vizsgálatából származik. Ez a két enzim a *Haemophilus haemolyticus*-ban található, 5'-GCGC-3' DNS-szekvenciát felismerő *HhaI* metiltranszferáz és a *Haemophilus aegyptius*-ból izolált, 5'-GGCC-3' felismerőhelyet metiláló *HaeIII* metiltranszferáz. Mindkét enzim esetében a kristályosításkor DNS-szubsztrátként 5-fluorocitozint tartalmazó oligonukleotidot használtak, így a modellekből a metilációs reakció során kialakuló kovalens fehérje-DNS komplex szerkezetét ismerhetjük meg. A szerkezetek sok szempontból hasonlítanak egymásra. Ez a C5-citozin metiltranszferázok primer szerkezetének hasonlósága ismeretében nem meglepő. A két röntgendiffrakciós modell azonban számos lényeges különbséget is mutat, ami azt jelzi, hogy a hasonló primer szerkezet ellenére a két enzim különböző módon lép kölcsönhatásba a felismerőhelyét tartalmazó DNS-sel.

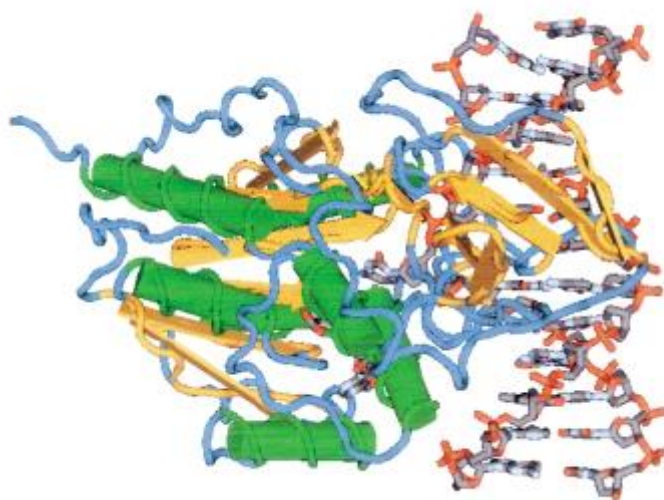
A *HhaI* metiltranszferáz felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezeti modellje

A *HhaI* metiltranszferáz a 5'-GCGC-3' felismerőszekvenciában a belső citozint metilálja. Ez volt az első olyan citozin metiltranszferáz, amelyből sikerült röntgendiffrakciós vizsgálatra alkalmas minőségű kristályt előállítani. Először az enzim metildonorral alkotott komplexének (Cheng és mtsai., 1993), majd a kovalens metiltranszferáz-DNS komplexnek a szerkezetét sikerült meghatározni (Klimasauskas és mtsai., 1994). A *HhaI*-DNS komplex kristályosítása során olyan hemimetilált DNS-oligonukleotidot használtak, amely a metilálandó citozin helyett 5-fluorocitozint tartalmazott. A

felismerőhely másik szála metilált volt, így a két lehetséges felismerőkomplex közül csak az egyik keletkezett, ez fontos feltétele volt mind a kristályosításnak, mind az eredmények interpretációjának. A komplex képzésében részt vett a metildonor SAM is, és a komplex kialakulásával a DNS metilációja is végbement, így a modellben a metilációs reakció utáni, metiltranszferázból, metilált DNS-ből és SAH-ból álló terner komplex szerkezetét látjuk.

A metilációs reakció egyik legérdekesebb jellegzetessége éppen a *HhaI* felismerőkomplex vizsgálata során felfedezett báziskifordulás (base flipping) jelenség. A *HhaI* metiltranszferáz a metilálandó citozint, a hozzátartozó dezoxiribózzal együtt teljesen kifordítja a DNS kettős spirálból (2.ábra). A kettős spirálból mintegy 180°-kal kifordult citozin így már kellő közelségbe kerül a SAM aktív metilcsoportjához. A citozinnal szemben levő árván maradt guaninnal a fehérje két aminosava hidrogénhidrkötéseket alakít ki, stabilizálva így a DNS-nek ezt az energetikailag kedvezőtlen konformációját.

(A)



(B)



2.ábra. (A) A *HhaI* metiltranszferáz felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezeti modellje. (B) A felismerőkomplexben a metilálandó citozin 180°-kal kifordul a DNS kettősspirálból.

A metiltranszferáz két doménből áll. A nagyobbik domént főleg a konzervált blokkok alkotják, itt található a SAM-kötőhely és itt vannak a katalízisben résztvevő aminosavak is. A kisebbik domén főként a variábilis régióból áll, és a metilálandó DNS-szakasz felismerését végzi. A fehérjének a bázisokkal alkotott specifikus kapcsolatai szinte kizárólag a DNS nagyárában valósulnak meg, kisárki kapcsolatok elenyésző mértékben vesznek részt a DNS kötésben. A fehérje a bázisokkal alkotott kölcsönhatásokon túl mind a felismerőhelyében, mind azon kívül, a DNS mindkét szálának cukor-foszfát gerincével is kapcsolatokat létesít.

A DNS szerkezetében a báziskiforduláson kívül más torzulást nem tapasztaltak.

A *HaeIII* metiltranszferáz felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezeti modellje

A másik C5-citozin metiltranszferáz, amelynek ismert a röntgendiffrakciós szerkezete, a *Haemophilus aegyptius*-ban található *HaeIII* metiltranszferáz. Az enzim a 5'-GGCC-3' felismerőszekvencián belül a belső citozint metilálja. A felismerőkomplex kristályosítása során ebben az esetben is a metilálandó citozin helyén 5-fluorocitozint tartalmazó hemimetilált DNS-szubsztrátot használtak. Az 5-fluorocitozin tartalmú DNS-sel alkotott kovalens komplex létrejöttéhez a *HaeIII* esetében is SAM jelenléte szükséges. Így a komplex kialakulása során a *HhaI* MTáznál tapasztaltakhoz hasonlóan végbement a metilcsoport átvitele. A komplexben a SAM-ból keletkező SAH viszont már nem volt jelen, a metilcsoport átadása után a kofaktor ledisszociált a fehérjéről.

A *HhaI* MTáznál tapasztaltakhoz hasonlóan a *HaeIII* metiltranszferáz-DNS komplexben is kifordul a metilálandó citozin a DNS kettős spirálból. A *HaeIII* metiltranszferáz DNS-kötése esetében a "base flipping"-en túl a felismerőhely további torzulása is tapasztalható. A kifordult citozinnal szemben levő árván

maradt guanin párt képez a felismerőhely külső citozinjával. A külső citozinnal szemben levő guaninnal a metiltranszferáz egyik argininje (R234) létesít hidrogénhidrkötést.

A *HaeIII* metiltranszferáz a *HhaI* metilázhoz hasonlóan két doménből épül fel. A nagyobbik domén tartalmazza az enzim aktív centrumát és a SAM-kötő zsebet. A kisebbik domént zömmel a variábilis régió alkotja, és a *HhaI* metiltranszferázhoz hasonlóan itt is ez végzi a specifikus DNS felismerést. A DNS bázisaival alkotott specifikus kapcsolatok egy kivétellel a nagy árokban történnek. A *HaeIII* metiltranszferáz felismerőhelyében és azon kívül is mindkét szálon számos kapcsolatot alkot a DNS gerinc foszfátcsoportjaival.

A *HaeIII* felismerőkomplex röntgendiffrakciós szerkezetében azonosított, a DNS-sel kölcsönhatásba lépő aminosavak a 5'-GGCC-3' felismerőhelyű metiltranszferázokban erősen konzerváltak. Így valószínű, hogy ezek az enzimek a felismerőhelyüket azonos módon ismerik fel (Finta és Kiss, 1997).

A DNS görbülése a specifikus fehérje-DNS-kölcsönhatások során

Számos bizonyíték utal arra, hogy a DNS-fehérje kölcsönhatások során mind a fehérjének, mind a DNS-nek megváltozik a szerkezete.

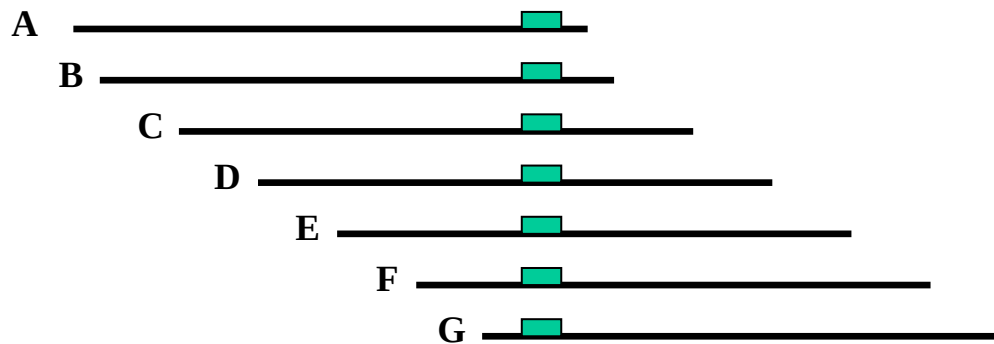
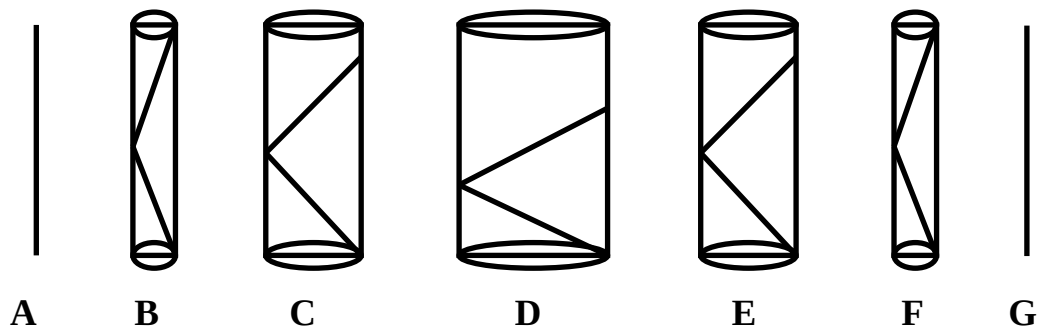
A DNS konformációja a specifikus felismerés során többféleképpen is megváltozhat. Előfordul, hogy a DNS-ben olyan változások mennek végbe, amelyek a B-DNS formától való eltérést eredményezik (Otwinowski és mtsai., 1988). A leggyakoribb konformációváltozás a fehérje által kiváltott görbület. Ez a DNS-görbítés nagymértékben hozzájárulhat a szekvenciaspecifikus felismeréshez, mivel elősegítheti a specifikus fehérje-DNS kapcsolatokat.

Az irodalomból rengeteg példát ismerünk arra, hogy egy specifikus fehérje-DNS komplexben a DNS meggörbül, és néhány esetben sikerült azt is bizonyítani, hogy a görbítés hozzájárul a szekvenciaspecifikus felismeréshez (Nagaich és mtsai., 1997).

A DNS-görbítés kimutatása

A DNS-fragmentumok görbülésének kimutatására több módszert is használhatunk: ligációs DNS-cirkularizáció, permutációs gélretardáció, elektronmikroszkóppal történő vizsgálat (Lane és mtsai., 1992). A legegyszerűbben kivitelezhető és leggyakrabban alkalmazott módszer a permutációs gélretardáció.

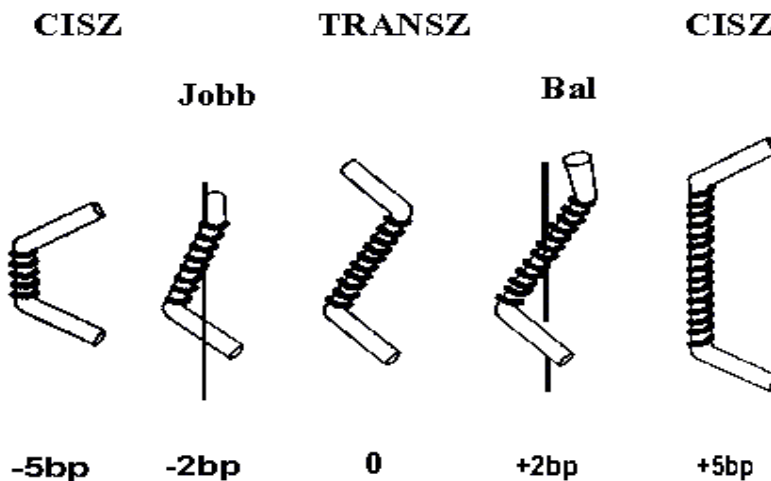
A gélretardáció alapja, hogy a gélelektroforézis során a DNS-fehérje komplex a gélben lassabban vándorol, mint a fehérjéhez nem kötődő, szabad DNS. A kísérletek során a DNS-t általában radioaktívan jelöljük és így elektroforézis után a kötött és a szabad DNS-fragmentumok helyzetét autoradiográfiával könnyen meghatározhatjuk. Az elektroforézis során a kialakult fehérje-DNS-komplex vándorlási sebességét többek között a komplexben levő fragmentum két végének egymástól mért távolsága határozza meg. Két azonos hosszúságú DNS-fragmentum közül az fog lassabban vándorolni, amelyik görbületet tartalmaz és így a két végének egymástól való távolsága kisebb, mint az ugyanolyan hosszúságú, de egyenes fragmentum esetében. A retardáció mértéke függ a görbület középpontjának elhelyezkedésétől is. Az azonos mértékben meghajlított fragmentumok közül az fog a gélben leglassabban vándorolni, amelyben a görbület középpontja a fragmentum közepén van. Ahogy a görbület középpontja a fragmentum végéhez közeledik, egyre nagyobb lesz a fragmentum két végének egymástól mért távolsága. Ennek eredményeként a retardációs hatás is kisebb lesz (Lane és mtsai., 1992) (3.ábra). Tehát azonos hosszúságú és a DNS-kötő fehérje felismerőszekvenciáját más-más pozícióban hordozó fragmentumokat használva, gélretardációs kísérletekben a DNS fehérje által okozott meggörbülését ki lehet mutatni, a görbület középpontját és mértékét meg lehet határozni.



3.ábra. Az egyenlő hosszúságú, cirkulárisan permutált DNS fragmentumok azonos mértékű meggörbülése esetén a fragmentumok eltérő térkitöltésük miatt a gélben különböző relatív mobilitással fognak rendelkezni.

A DNS-görbülés irányának meghatározása

A DNS-görbítés irányát un. “phasing” analízissel határozhatjuk meg. Az analízishez a gélretardáció során olyan fragmentumokat kell használni, amelyek tartalmazzák a vizsgálandó DNS-kötő fehérje felismerőszekvenciáját, és a fragmentumon egy ismert irányú DNS-görbületet is hordoznak. A DNS-kötő fehérje által okozott görbület és a fragmentum saját görbülete közötti távolságot változtatva különböző mobilitású fragmentumokat kapunk (4.ábra).



4.ábra. A két DNS-görbület között lévő távolságot változtatva a DNS helikális szerkezete miatt változni fog a két görbület egymáshoz viszonyított iránya, amely különböző relatív mobilitású fragmentumokat eredményez.

Leggyorsabban vándorol az a fragmentum, amelyikben a DNS-görbületek “ellentétes irányúak” (transz helyzet). Leglassabban mozog az a fragmentum, amelyikben a két görbület “azonos irányú” (cisz helyzet). Az ismert irányú DNS-görbület és az általunk vizsgált fehérje által kiváltott görbület középpontja közötti távolságot változtatva, a DNS helikális szerkezete miatt változik a két görbület egymáshoz viszonyított iránya és ezzel a fragmentumok gélelektroforézis során tapasztalható mobilitása. Így a vizsgált, fehérje által indukált DNS-görbület iránya meghatározható.

A II. típusú metiltranszferázok által kiváltott DNS-hajlítás

Eddig csak néhány II. típusú metiltranszferáz esetében vizsgálták, hogy történik-e DNS-hajlítás a DNS-enzim komplex kialakulása során.

A 5'-GATATC-3' szekvenciát felismerő, és a G és T közötti adenint metiláló *EcoRV* metiltranszferáz a specifikus komplexben a DNS-t $\sim 62^\circ$ -os szögben görbítette a nagy árok felé. Az enzim által indukált DNS-görbítés nem

függött a felismerőhely metiláltságától, az enzim mind a metilálatlan, mind a hemimetilált, illetve teljesen metilált felismerőhelyet tartalmazó DNS-t közel azonos mértékben hajlította meg (Cal és Connolly, 1995).

Permutációs gélretardációval egy másik adenin metiltranszferázról, az *EcoRI* metilázról is kimutatták, hogy a specifikus DNS-fehérje komplex kialakítása során mintegy 52°-os DNS-görbítés történik. A DNS enzim által indukált meghajlását elektronmikroszkópos technikával is megerősítették (Allan és mtsai., 1999).

A C5-MTázok közé tartozó *HhaI* metiltranszferáz felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezetében nem tapasztalható a DNS meggörbülése (Klimasauskas és mtsai., 1994). Garcia és munkatársai permutációs gélretardációval 2°-os görbítést tudtak kimutatni, a felismerőkomplexről készült elektronmikroszkópos felvételek is csak csekély DNS hajlítást mutattak (Garcia és mtsai., 1996).

Ezzel szemben egy másik C5-MTáz, a 5'-CCGG-3' szekvenciát felismerő *MspI* metiláz drámai mértékben, mintegy 140°-kal görbíti meg a felismerőhelyét tartalmazó DNS-t (Dubey és Bhattacharya, 1997).

A vizsgált metiltranszferázok néhány jellemzője

A *Bacillus sphaericus*-ból izolált *BspRI* metiltranszferáz a 5'-GGCC-3' szekvenciában a belső citozint metilálja. A metiláció eredménye 5-metilcitozin. A MTáz kódoló gén klónozása lehetővé tette a *bspRIM* gén nukleotidsorrendjének meghatározását (Szomolányi és mtsai., 1980; Pósfai és mtsai., 1983), az enzim *E. coli*-ban való túltermeltetését és homogenitásig történő tisztítását (Pósfai és mtsai., 1986). A *BspRI* MTáz monomer felépítésű enzim, molekulatömege 52 kDa (Koncz és mtsai., 1978). A *BspRI* metiltranszferáz képes a DNS felismerőhelyének specifikus kötésére a másik szubsztrát (SAM) jelenléte nélkül (Kovács, 1991). Az enzim DNS hiányában

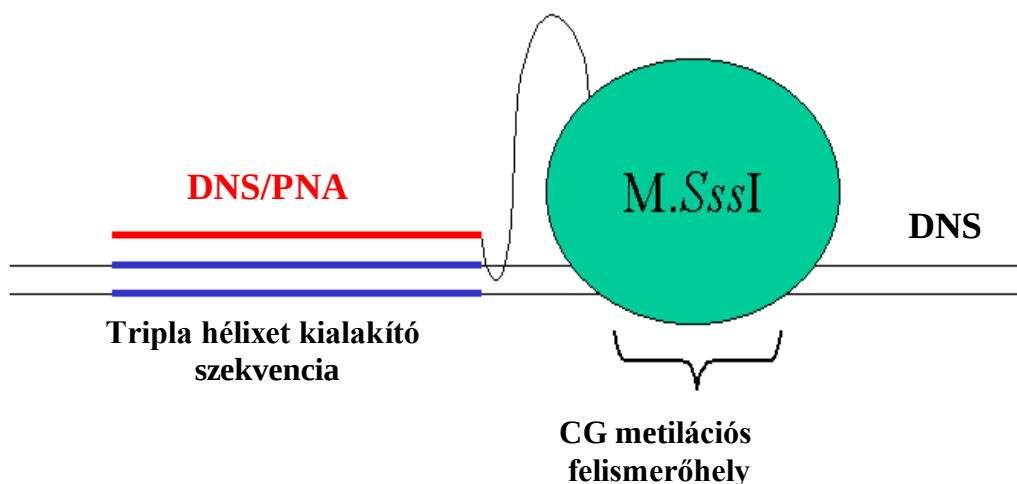
képes önmagát metilezni egy lassú reakcióban (Szilák és mtsai., 1994). A DNS önmetilézési reakciójában a katalízisben központi szerepet játszó, konzervatív ciszteinre (C156) kerül át a metilcsoport. A katalitikus cisztein metilálódásával az enzim inaktiválódik (Szilák és mtsai., 1994). Footprintes kísérletekben megfigyelték (Finta és Kiss, 1997), hogy a DNázI, illetve a dimetilszulfát fokozottan reagált a felismerőkomplexben lévő DNS bizonyos pontjaival. Ez a DNS-nek az enzim hatására bekövetkező konformációváltozására utalt. A metiltranszferáz a kisárok-specifikus orto-fenantrolin-Cu(II)-komplex hasításától nem védte a DNS-t. Így valószínű, hogy a *BspRI* MTáz specifikus DNS-kötésében kisárki kapcsolatok nem játszanak fontos szerepet. A *BspRI* metiltranszferázzal azonos szekvenciát ismer fel a *Haemophilus aegyptius*-ból izolált *HaeIII* metiltranszferáz. Ez az enzim is a 5'-GGCC-3' szekvencia belső citozinját metilálja, a metiláció eredménye itt is 5-metilcitozin. A *HaeIII* metiltranszferáz DNS-sel alkotott felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezete ismert (Reinisch és mtsai., 1995).

A *Staphylococcus aureus*-ból izolálható *Sau96I* metiltranszferáz a GGNCC szekvenciát ismeri fel (N bármely bázis lehet) és a belső citozint metilálja (Szilák és mtsai., 1990). A *SinI* metiltranszferáz génjét Karreman és munkatársa izolálták először *Salmonella infantis*-ból (Karreman és de Waard, 1988). A metiltranszferáz a GGA/TCC szekvenciában a belső citozint metilálja. Az enzim *E. coli*-ban történő túltermeltetését és homogenitásig való tisztítását csoportunk végezte (Kiss és mtsai., 2001). A *HpaII* metiltranszferáz génjének klónozását *Haemophilus parainfluenzae*-ból és nukleotidszekvenciájának meghatározását Card és munkatársai végezték (Card és mtsai., 1990). A metiltranszferáz a CCGG szekvenciát ismeri fel és a belső citozint metilálja (Quint és Cedar, 1981).

“Programozható” specifitású SssI metiltranszferázok előállítása

A genom szekvenáló programokból származó információ megértését nagy mértékben segíthetné, ha képesek lennénk a genomiális DNS-ben egy-egy, a génregulációban fontos hely szelektív metilálására. Ez a feladat elvben megvalósítható lenne úgynevezett programozható specifitású metiltranszferázok előállításával. 2001-ben csoportunk egy nemzetközi konzorcium tagjaként elnyerte az EU 5. keretprogramjának kutatási támogatását tetszőlegesen módosítható, "programozható" specifitású C5-citozin metiltranszferáz előállítására. Az elképzelésünk szerint, ha egy C5-MTázt kovalensen hozzákapsolunk egy oligonukleotidhoz (ODN), vagy egy peptid nukleinsavhoz (PNA), akkor az enzim specifitását részben az fogja meghatározni, hogy a PNA, illetve az ODN affinitásfark a genom mely szekvenciájához fog kötődni (5.ábra). A cél, hogy az ODN-nel, illetve a PNA-val konjugáltatott SssI MTáz variánsok alkalmasak legyenek arra, hogy szövettenyészetekbe juttatva egy adott gén promóterét *in vivo* szelektíven metilálják és ezáltal a gén transzkripcióját megszüntessék. A különböző szekvenciájú ODN és PNA karok a metiltranszferázt így programozható specifitásúvá alakítanák át.

Az elmúlt évtized egyik jelentős kutatási területének számít olyan új kémiai reagensek előállítása, amelyek nagy affinitással képesek kötődni a kettősszalú DNS-hez. A specifikus DNS-hez való kötődésre képes anyagok felfedezése új távlatokat nyithat a génterápiás eljárásoknak, új lehetőségeket adhat a molekuláris biológusok, biotechnológusok kezébe. Az elmúlt évek eredményei azt bizonyítják, hogy a legígéretesebb ilyen vegyületek a peptid nukleinsavak (Kosaganov és mtsai., 2000, Nielsen, 2001).



5.ábra. A peptid nukleinsav (PNA) illetve az oligodezoxinukleinsav (ODN) és a kettősszálú DNS specifikus tripla hélix kapcsolata.

Előnyük, hogy nukleázokkal szemben rezisztenciát mutatnak. Szerkezetük hasonló az oligodezoxinukleotidokéhoz, csak a bázisokat nem foszfodiészter, hanem peptid-kötés köti össze. A PNA-k mind egyesszálú, mind a kettősszálú DNS molekulákkal képesek kölcsönhatást kialakítani. A PNA és a kettősszálú DNS specifikus tripla hélixet képez, amelyben a PNA és a DNS bázisai között a Watson-Crick féle hidrogén-híd kötések törvényszerűsége érvényesül (Ray és Nordén, 2000).

Az elmúlt hat év kutatómunkája bizonyította, hogy létre lehet hozni olyan fúziós C5-MTázokat, amelyek specifikitását részben a fúziós partner határozza meg. Xu és Bestor előállítottak olyan Zif268-M.SssI fúziós metiltranszferázt, amely csak a Zif268 felismerőhely környezetében lévő CG dinukleotidokban található citozinokat metilálta (Xu és Bestor, 1997). McNamara és munkatársainak két másik C5-MTáz (M.HpaII, M.HhaI) cink-finger motívumot hordozó fehérjével alkotott konjugátumát sikerült létrehozni (McNamara és mtsai., 2002). Mind a Zf-M.HpaII, mind a Zf-M.HhaI fúziós metiltranszferáz megtartotta metilációs képességét a konjugáció után. A fúziós

metiltranszferázok kb. 20-szor nagyobb affinitással kötődtek olyan DNS-hez, amely mind a cink-finger partner, mind a metiláz felismerőhelyét is tartalmazták, mint ahhoz a DNS-hez, amely csak a metiláz felismerőhelyét hordozta. A Zf-M.*HpaII* konjugátum, a Zf és a *HpaII* felismerőhelyet is tartalmazó oligonukleotidot ~11-szer nagyobb aktivitással metilálta, mint a csak a *HpaII* helyet hordozó oligonukleotidot. A Zif268-M.*SssI* és a Zf-M.*HpaII* konjugátumoknál felmerült az a probléma, hogy a fúziós metiltranszferázok nem csak a cink-finger partner és a metiláz felismerőhelyét tartalmazó DNS-t metilálják, hanem a cink-finger partner felismerőhelyét nem tartalmazó DNS-t is. Ezt a problémát talán csökkent DNS-kötő képességgel rendelkező M.*HpaII*, illetve M.*SssI* mutánsok felhasználásával lehet megoldani.

Az *SssI* metiltranszferázzal kapcsolatos munka kollaborációs jellegű. A csoportunk feladata olyan *SssI* MTáz variánsok létrehozása, amelyek alkalmasak oligodezoxinukleotidokhoz (ODN), illetve peptid nukleinsavakhoz (PNA) való kovalens kötésre. Az M.*SssI* ODN/PNA-hoz való kapcsolását a kollaborációs partnerek fogják végezni. Azért esett a választásunk a *Spiroplasma sp.*-ből izolálható *SssI* metilázra, mert egyrészt ez a legkisebb specifitású C5-MTáz, ezáltal a legalkalmasabb arra, hogy a specifitását „programozhatóvá” tegyük, másrészt felismerőszekvenciája megegyezik a humán C5-MTázéval (CG). Az M.*SssI* olyan C5-MTáz, amely egy DNS molekulán belül a CG szekvenciákat processziven metilálja (Renbaum és Razin, 1992). Érdekes tulajdonsága, hogy Mg^{2+} inok jelenlétében topoizomeráz aktivitást mutat (Matsuo és mtsai., 1994).

A cél: úgy módosítani az M.*SssI* metiltranszferázt, hogy alkalmas legyen a kovalens kapcsolási reakciókra. Mivel figyelembe kellett vennünk azt is, hogy a variánsok könnyen tisztíthatóak legyenek, megpróbáltunk fúziós változatokat is létrehozni.

Az ODN és a PNA M.*SssI* metiltranszferázhoz való kovalens kötésére több módszer is alkalmasnak látszik. A bifunkcionális reagenssel való keresztkötéshez az *SssI* metiltranszferázt úgy kell módosítani, hogy annak C-

vagy N-terminális végén egy cisztein legyen. Az SssI metiltranszferáz működéséhez feltétlenül szükséges a katalitikus aktív helyet alkotó cisztein (C141) mellett még egy cisztein van (C368). Célszerűnek látszott ennek más aminosavra való cserélése.

Az SssI MTáz-ODN/PNA kovalens komplex előállítására a kémiai peptid ligációt is alkalmazhatjuk (Dawson és mtsai., 1994). A módszer feltétele, hogy a fehérje N-terminális aminosava cisztein legyen. Az enzimben található további ciszteinek a kötési reakciót nem befolyásolják. Ahhoz, hogy az N-terminális cisztein kritérium, illetve a könnyen tisztíthatóság feltételének eleget tegyünk, olyan M.SssI variánsokat terveztünk létrehozni, amelyek N-terminálisan egy fúziós fehérje partnert hordoznak. A partner kiválasztásakor annak a követelménynek kellett megfelelni, hogy a fúziós rész proteázzal való lehasítása N-terminális ciszteint eredményezzen. Ezért csak olyan fúziókat tervezhettünk, amelyek megengedik, hogy a specifikus proteáz hasítás a teljes "idegen" részt eltávolítja. Ennek feltétele, hogy a fúziós partner eltávolítására szolgáló proteáz hasítás a proteáz felismerőhely C-terminális határán történjen. Így kizárólag az Xa faktor és az enterokináz felismerőhelyeket tartalmazó vektorok jöhettek számításba, de például a trombin felismerőhelyet tartalmazóak nem.

Anyagok és módszerek

Enzimek és reakciókörülmények

A *Sau96I*, *SinI* és a *BspRI* metiltranszferázokat *Escherichia coli* túltermelő törzsekből az SzBK Biokémiai Intézetében preparálták. Mindhárom enzim tisztasága legalább 95%-os volt, amelyről SDS-poliakrilamid gélelektroforézis (Sambrook és mtsai, 1989) után történő Comassie Brilliant Blue festéssel győződünk meg. A *HhaI* metiltranszferáz preparátumot S. Klimasauskas (Institute of Biotechnology FERMENTAS, Vilnius, Litvánia) bocsájtotta rendelkezésünkre. A *HaeIII* metiltranszferázt, a Mung Bean nukleázt a New England Biolabs, a *HpaII* metiltranszferázt a Fermentas cégtől vásároltuk. Az utóbbi két enzim koncentrációját ismert mennyiségű *BspRI* metiltranszferáz együttes SDS-poliakrilamid gélelektroforézise után becsültük meg. A munka során felhasznált restrikciós endonukleázok, a T4 polinukleotid-kináz, a DNS-polimeráz I Klenow-fragmentje, a T4 DNS-ligáz, a *Taq* DNS polimeráz a Fermentas-tól származott. Az 5'-[α - ^{32}P]dATP-t és az 5'-[γ $^{32}\text{-P}$]ATP-t (3000 Ci/mmol) az Izotóp Intézet Kft.-től vásároltuk. A linkereket illetve a PCR reakciókban használt DNS primereket a New England Biolabs-tól, valamint az Integrated DNA Technologies cégektől szereztük be.

Baktérium és fág törzsek

A kísérletekben az alábbi baktérium és fág törzseket használtuk:

Törzs	Genotípus	Referencia
<i>Escherichia coli</i> ER1398	<i>F⁻endA1 hsdR supE44 thi1 mcrB1 relA1</i>	(Raleigh és Wilson, 1986)
<i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue MRF' Kan ^r	$\Delta(mcrA)183\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lacI^qZ\Delta M15 Tn5 (Kan^r)]$	(Stratagene katalógus, 1997)
<i>Escherichia coli</i> ER1821	<i>F⁻glnV44 e14⁻ (McrA⁻) rfbD1? relA1? endA1 spoT1? thi-1 $\Delta(mcrC-mrr)114::IS10$</i>	(New England Biolabs katalógus, 2001)
<i>Escherichia coli</i> K1053=BW313	<i>HfrKL16 PO/45[lysA(61-62)], dut1 ung1 thi1 relA1</i>	(Kunkel és mtsai, 1987)
f1 R176 fág		(Russel és mtsai., 1986)
λ CE6 fág		(Studier és mtsai., 1990)

A baktériumok tenyésztése általában Luria-Bertani táptalajban (LB) történt 30° vagy 37 °C-on. Az LB táptalajt szükség esetén 100µg/ml ampicillinnel, 50µg/ml kanamicinnel vagy 12,5 µg/ml tetraciklinnel egészítettük ki. Az elektroporációt követően a transzformált sejteket SOB (Sambrook és mtsai.,

1989) tápfolyadékban regeneráltattuk. A felhasznált baktériumtörzsek szilárd táptalajon való növesztéséhez 1,5 % agarral kiegészített LB lemezeket használtunk (Sambrook és mtsai., 1989).

A DNS-oldatok koncentrációjának meghatározása

A DNS-oldatok koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg. Kettőszálú DNS esetében az $A_{260}=1$ abszorpciót 50 µg/ml DNS-koncentrációnak tekintettük (Sambrook és mtsai., 1989). Az egyesszalú oligonukleotidok esetében a megfelelő extinkciós koefficiens kiszámítása az oligonukleotid bázisösszetétele szerint történt (Fasman, 1975).

Plazmid DNS tisztítás

Plazmid DNS-t rutinszerűen 1,5 ml kultúrából alkalikus feltárással (Sambrook és mtsai., 1989) tisztítottunk. Nagyobb mennyiségű plazmidot (100 ml kultúrából) az alkalikus lízist követően diatomaföld használatával nyertünk a következő módon:

100 ml sűrű baktériumkulturából a sejteket centrifugálással kiülepítettük (20 perc, 4000 g). A sejteket 4 ml 50 mM glükóz, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA oldatban szuszpendáltuk és 10 µl 10 mg/ml RN-ázt adtunk hozzá. Az 5 perces szobahőmérsékleten való inkubáció után a baktériumszuszpenzióhoz 6 ml 0,2 M NaOH és 1 % SDS tartalmú oldatot adtunk, majd az inkubációt jégen folytattuk tovább 5 percig.

A lízis után 5 ml 5 M K-acetát pH 4,8 oldatot adtunk az elegyhez, majd további 15 percig jégen inkubáltuk. A csapadékot centrifugálással kiülepítettük (30 perc, 30000 g). Annak érdekében, hogy a csapadéktól tökéletesen megszabaduljunk, a felülúszót ismételten centrifugáltuk (30 perc, 30000 g).

Az így kapott felülúszóhoz 12 ml 7 M guanidin-HCl, 1 % diatomaföld szuszpenziót adtunk, majd 3 perces erős rázatást követően a diatomaföldet centrifugálással kiülepítettük (2 perc, 4000 g). A kiülepített diatomaföldet, amely a plazmid DNS-t már kötötte, háromszor mostuk 10-10 ml 0,2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EDTA és 55 % etanol oldattal, majd kétszer 15 ml 80 %-os etanollal. A második etanolos mosás után a szobahőmérsékleten megszárított diatomaföldről a plazmid DNS-t 60 °C-os vízzel eluáltuk. A DNS-t fenol-kloroformos (1:1), majd kloroformos kirázással, végül etanolos kicsapással tisztítottuk tovább. A kicsapott plazmid DNS-t 10 mM Tris-HCl pH 8,0 és 1 mM EDTA (TE) pufferben oldottuk fel.

Agaróz-gélelektroforézis

A DNS-minták gélelektroforézise 1,0-1,8 %-os horizontális agaróz gélben történt. Az elektroforézishez 50 mM Tris-HCl, 50 mM bórsav, 1 mM EDTA pH 8,3 (TBE) puffert használtunk. A DNS-t a gélben 0,5 µg/ml etidium-bromiddal festettük, és áteső, 254 nm hullámhosszúságú ultraibolya fénnel tettük láthatóvá.

Poliakrilamid gélelektroforézis

A radioaktívan jelölt PCR termékeket 8 %-os poliakrilamid gélből izoláltuk. A gélben az akrilamid és a bis-akrilamid aránya 29:1 volt. Az akrilamid gél készítésénél 1xTBE puffert használtunk.

A komplexeket és a szabad DNS-t 6 %-os poliakrilamid gélben történő gélelektroforézissel választottuk el. A gél 1xTBE puffert, 5 % glicerint és minden esetben, kivéve a *M.HpaII*-t, 2 µM S-adenozil-L-homociszteint tartalmazott. A géleket 4 °C-on, 200 V feszültség mellett 3 óráig futtattuk.

Elektroforézis után a gélt 10 % ecetsavat és 10 % etanolt tartalmazó oldatban fixáltuk, majd beszárítottuk.

A fehérje mintákat rutinszerűen 10 %-os SDS-poliakrilamid gélen futtattuk, majd Comassie Brilliant Blue festékkel tettük láthatóvá (Sambrook és mtsai.1989).

DNS tisztítás agaróz-gélből

A DNS agaróz gélből történő izolálását a Clontech cég NucleoTrap, vagy a QIAGEN cég által gyártott QIAEX kit-ekkel végeztük.

DNS tisztítás poliakrilamid-gélből

A poliakrilamid gélből való DNS-tisztítás az un. “crush and soak” (Sambrook és mtsai., 1989) módszerrel történt. Az izolálni kívánt DNS-fragmentumot tartalmazó géldarabot 16 órán keresztül 0,5 M NH_4 -acetátot, 10 mM Mg-acetátot, 1 mM EDTA-t és 0,1 % SDS-t tartalmazó oldatban áztattuk. A gélből kidiffundált DNS-t etanollal kétszer kicsaptuk, majd 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. Ezután a mintát 2 percig 42 °C-on inkubáltuk. A hőkezelés után a sejtekhez 1 ml LB táptalajt adtunk és egy órán keresztül 37 °C-on ráztuk. A rázatást követően 100 μl mennyiséget megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezre szélesztettünk.

Az elektroporáció során az elektrokompetens sejtek készítését és a baktériumok elektroporációját a Hengen által javasolt módszerrel (Hengen, 1995) egy Invitrogen Electroporator II készülékben (150 Ω -os ellenállás, 50 μ F-os kapacitás, 15000 V/cm térerő, 7,5 ms) végeztük.

Linkerek beépítése

A linkerek beépítése két különböző módszer alapján történt, figyelembe véve azt, hogy a feleslegben beépült DNS oligomereket el tudtuk-e restriktáz emésztéssel távolítani vagy sem.

Foszforilált linker beépítés

A T4 polinukleotid kinázzal foszforilált linkereket nagy feleslegben (~4000:1) az előkészített linearizált vektorhoz ligáltuk. A ligálási reakció 16 °C-on 16 órán keresztül történt. A ligálást követően a T4 DNS-ligázt 65 °C-on inaktiváltuk, majd a DNS-t azzal az endonukleázzal emésztettük, amelynek a felismerőhelyét a linker tartalmazta. Annak érdekében, hogy a be nem épült, illetve az emésztés során eltávolított linker-fragmentumoktól megszabaduljunk, az emésztés után a plazmid DNS-t agaróz gélből izoláltuk. A plazmidot ezt követően T4 DNS-ligázzal cirkularizáltuk. Ezzel a módszerrel építettük be az *Apa*I linkert.

Foszforilálatlan linker beépítés

A linearizált plazmidokhoz a T4 DNS-ligáz segítségével foszforilálatlan linkereket ligáltunk. A ligálás 20 μ l-es reakcióelegyben történt: 500 ng linearizált plazmid, $\approx$ 2,5 μ g foszforilálatlan linker, 30 mM NaCl, 30 mM Tris-

HCl pH 7,5, 7,4 mM MgCl₂, 250 µM ATP, 2 mM ditioneitol (DTT), 200 µM EDTA, 1 mM spermidin, 0,1 mg/ml marha-szérumalbumin (BSA), 5 egység T4 DNS-ligáz. Az inkubációt 16 °C-on 16 órán keresztül végeztük. A ligálás után a DNS-t fenolos kirázással és etanolos kicsapással tisztítottuk. A módszer nagy előnye, hogy csak egyetlen linker épül be. Így építettük be a *Pst*I linkereket, az AK11, AK32 oligonukleotidokat és az AK27-AK28, AK83-AK84, AK87-AK88 oligoduplexeket.

DNS szubsztrátkészítés a gélretardációs módszerhez

A permutációs gélretardációhoz szükséges radioaktívan jelölt DNS fragmentumokat polimeráz láncreakcióval állítottuk elő, templátként a pBend-GGCC, pBend-GGWCC, pBend-CCGG és a pBend-GCGC plazmidokat használva. A PCR reakciókban primerként a bend1 és a bend2 vagy némely esetben az AK29 és az AK30 oligonukleotidokat használtuk. A primerek a plazmidok polilinker végeihez hibridizálnak (6.ábra). A reakcióelegy összetétele a következő volt: 50 ng plazmid DNS, 100 pmol primer oligonukleotidok, 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 % Triton-X100, 250 µM dNTP mix, 6 pmol dezoxiadenozin 5'-[α-³²P]trifoszfát és 2,5 egység *Taq* DNA polimeráz. A polimeráz reakció 30 ciklusa a következő lépésekből állt: denaturáció: 94 °C, 30 mp; primer hibridizáció (annealing): 55 °C, 30 mp; polimerizáció: 72 °C, 30 mp. A DNS-t 1 ml-es Sephadex G-50-el (Pharmacia) töltött oszlopon géliszűrővel, majd fenolos kirázással és etanolos kicsapással tisztítottuk, majd TE pufferben oldottuk.

A radioaktívan jelölt PCR terméket poliakrilamid gélből izoláltuk, majd a cirkulárisan permutált fragmentumsorozat létrehozása céljából a megfelelő restrikciós endonukleázzal emésztettük (6.ábra).

A metilált fragmentumokat a poliakrilamid gélből izolált PCR termék *in vitro* metilálásával, majd a megfelelő restrikciós endonukleázokkal történő

emésztéssel nyertük. Az *in vitro* metilálást *Bsp*RI metiltranszferázzal végeztük 37°C-on 30 percig. A metilációs reakció körülményei: 100 pmol *Bsp*RI metiltranszferáz, 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 7 mM β -merkaptoetanol, 5 μ M SAM. Annak érdekében, hogy a fragmentumok metiláltsága teljes legyen, a reakciót kétszer megismételtük. A fragmentumok metiláltságát *Bsp*RI endonukleázzal való emésztéssel ellenőriztük. A metilált radioaktív DNS-t fenol-kloroformos (1:1), kloroformos kirázással, majd etanolos kicsapással tisztítottuk, majd TE pufferben oldottuk.

A permutációs gélretardáció reakciókörülményei

A gélretardációs kísérletekben a radioaktív, permutált DNS-fragmentumok és a metiltranszferázok kötési reakciókörülményei az alábbiak voltak. A kötési reakciókba radioaktívan jelölt (≈ 3000 cpm) DNS fragmentumot mértünk be. A reakcióelegy további komponensei a következők voltak:

M.*Bsp*RI reakció: 0.4 μ M M.*Bsp*RI, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 μ M S-adenosil-L-homocisztein (AdoHcy), 40 μ g/ml polydI·dC, 10 mM EDTA, 7 mM 2-merkaptoetanol.

M.*Hae*III reakció: 0.4 μ M M.*Hae*III, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 2 μ M AdoHcy, 100 μ g/ml polydI·dC, 50 mM NaCl, 10 mM ditiotritol.

M.*Hha*I reakció: 0.5 μ M M.*Hha*I, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 μ M AdoHcy, 100 μ g/ml polydI·dC, 10 mM EDTA, 5 mM 2-merkaptoetanol.

M.*Sin*I reakció: 2 μ M M.*Sin*I, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 μ M AdoHcy, 50 μ g/ml polydI·dC, 10 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol.

M.*Sau*96I reakció: 0.3 μ M M.*Sau*96I, 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 2 μ M AdoHcy, 100 μ g/ml polydI·dC, 50 mM NaCl, 10 mM ditiotritol.

M.HpaII reakció: 0.25 μ M M.HpaII, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 μ M sinefungin, 50 μ g/ml polydI·dC, 1 mM ditioneitol, 20 mM NaCl.

A kötési reakciók 5 vagy 10 μ l térfogatú reakcióelegyben, 22 °C-on történtek az M.BspRI, M.HaeIII, M.HhaI és az M.Sau96I enzim esetében 5 percig. A SinI metiláz kötését 32 °C-on 5 percig, a HpaII metiláz kötési reakcióját pedig 37 °C-on 15 percig csináltuk. A gélretardációs kísérletekben az aspecifikus DNS-fehérje komplexek kialakulását a reakcióelegybe adott szintetikus poli(dI.dC) polinukleotiddal előztük meg.

DNS szubsztrátkészítés "phasing" analízishez

A DNS görbítés irányának meghatározása céljából négy plazmidot hoztunk létre (pBSuf1, pBSuf11, pBSuf12, pBSuf13), amelyek az egyedi GGCC felismerőhelytől különböző távolságra egy ismert irányú és mértékű görbületet hordozó DNS szakaszt tartalmaztak. A pBend28 plazmidot Boros Imre (MTA SzBK Biokémiai Intézet) bocsájtotta rendelkezésünkre. Ez a plazmid egy EcoRI-SalI fragmentumon (7.ábra) a pBend2 plazmid (Kim és mtsai., 1989) polilinkerének felét és egy poli-A/T szakaszt hordozott. Ezt a DNS fragmentumot ültettük át pBluescript SKII(+) fágmidba, létrehozva a pBSuf1 plazmidot. A pBSuf11 plazmidot a pBSuf1 plazmid Acc65I endonukleázzal történő emésztése, majd a végek Klenow polimerázzal való feltöltésével és újraligálásával kaptuk. A pBSuf12 plazmidot, a pBSuf11 plazmid BamHI hasítása, majd Klenow polimerázzal való feltöltése utáni újraligálásával hoztuk létre. Végül a pBSuf13 hasonló módszerrel, a pBSuf12 plazmidból készült úgy, hogy a plazmidot XbaI helyen hasítottuk.

```

EcoRI
GAATTCACGCGTAGATCTGCTAGCATCGATCCATGGACTAGTCTCGAGTTTAAAGATATCCAGCT 65

          (+4)          (+4)  (+4)
          Acc65I        BamHI XbaI
GCCCCGGAGGCCTTTCGCGAAATATTGGTACCCCATGGAATCGAGGGATCCTCTAGAGTCGATGCC 130
GCCCTCCGGGAAGCGCT AK12
          m5

                      SalI
CGTTTTTGCCCGTTTTTGCCCGTTTTTGTCGAC
          ↑
GTAAAACGACGGCCAGT M13/pUC primer

```

7.ábra. A phasing analízishez használt DNS fragmentumok és a primerként felhasznált oligonukleotidok szekvenciája. A két DNS görbület közötti távolságot az *Acc65I* (+ 4bp), a *BamHI* (+8 bp) és az *XbaI* (+12 bp) helyek feltöltésével változtattuk. (pBSuf11, pBSuf12, pBSuf13 plazmidok készítése). A nyíl a poli-A/T szakasz görbületének középpontját jelzi. Fekete háttérrel a *HaeIII* metiltranszferáz felismerőhelyét ábrázoltuk.

A plazmidokat *E. coli* XL1-Blue MRF⁺ Kan^r baktériumba transzformáltuk, majd az egyesszálú plazmid DNS-eket a következő módon tisztítottuk: A tenyészetet 37 °C-on OD: 0,2-0,3 sűrűségig növesztettük, majd f1 R176 fággal 30-szoros multiplicitás mellett megfertőztük. A fertőzés után további 5 órán keresztül erős rázatás mellett növesztettük a kultúrákat. A sejteket centrifugálással ülepítettük, majd a felülúszó 23 ml-éhez 4,6 ml 20% PEG, 2,5M NaCl oldatot adtunk. A kicsapódott, egyesszálú fágmid DNS-t tartalmazó fágreszecskéket lecentrifugáltuk (8000 rpm, 30 perc, 4 °C), majd a csapadékot 400 µl TE pufferben feloldottuk. A DNS-t fenol-kloroformos (1:1), kloroformos kirázással, majd etanolos kicsapással tisztítottuk. A metilált citozint tartalmazó AK12 oligonukleotidot T4 polinukleotid kinázzal, adenzin-5'-[γ -³²P]trifoszfát felhasználásával 37°C-on 10 perces reakcióban végjelöltük. Az egyesszálú fágmid DNS-hez, mint templáthoz, hibridizáltattuk az AK12 és a M13/pUC –20-as primereket 20-20 pmol mennyiségben. A hibridizációhoz az elegyet először 95°-on 5 percig melegítettük, majd lassan szobahőmérsékletűre hűtöttük.

A komplementer szál szintézise a következő reakcióelegyben történt: hibridizált templát/primer DNS, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1 mg/ml marha-szérum-albumin (BSA), 0.5 mM dNTP mix, 1 mM ATP, 5 egység T4 DNA polimeráz és 5 egység T4 DNA ligáz. A 2,5 órás szintézis után az elegyet 1 ml-es Sephadex G-50-el (Pharmacia) töltött oszlopon géliszűrőssel, majd fenolos kirázással és etanolos kicsapással tisztítottuk. A kicsapott DNS-t TE pufferben oldottuk. Az így kapott DNS *EcoRI*+*SalI* emésztésével nyertük a phasing analízishez használt fragmentumokat. A kötési reakciók és a gélretardáció körülményei a permutációs gélretardáció körülményeivel azonosak voltak.

A poliakrilamid gélekben a radioaktív mintákat autoradiográfiával vagy Phosphor Image Analyzer-rel (Molecular Dynamics 445SI) tettük láthatóvá. Az autoradiográfia során a beszárított gélre filmet (Forte, X-ray) raktunk, és rendszerint erősítőfóliát alkalmazva 12 órán át exponáltuk. A Phosphor Image Analyzer-rel digitalizált képeket az ImageQuant nevű programmal értékeltük.

PCR reakciók és a T/A klónozás

A PCR reakciókat rutinszerűen 50 µl végtérfogatban a következő körülmények között végeztük: 50-100 ng pCAL7 plazmid DNS templát, primer oligonukleotidok 10-10 pmol, 250 µM dNTP mix, 1,5-2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 % Triton-X100, 2,5 egység *Taq* DNS polimeráz. A reakciók ciklusai a következők voltak: 94 °C 5 perc, 25 cikluson keresztül 94 °C 30-40 mp, hibridizáció a primer oligonukleotidok hosszának megfelelően 30-40 mp, a hibridizációs hőmérsékletet az alacsonyabb olvadáspontú (*T_m*) primer oligonukleotid *T_m* értékénél 5 °C-al alacsonyabb hőmérsékleten végeztük, a szintézis 72 °C-on 30-40 másodpercig folyt. Az utópolimerizáció 5 percig 72 °C-on történt. A termékeket a fragmentizoláló

kitek segítségével agaróz gélből tisztítottuk, majd 0,1-0,3 µg pTZ57R/T (Fermentas Inst/A Clone™ PCR Product Cloning Kit) plazmidhoz 16 °C-on 16 órán keresztül ligáltuk. Mivel a *Taq* DNS polimeráz nem rendelkezik 3'=>5' exonukleáz aktivitással, viszont dezoxinukleotidil-transzferáz (TdT) aktivitással igen, a PCR reakcióban keletkezett termékek 3' végei egy extra adenin bázist fognak hordozni. Ezeknek a fragmentumoknak a klónozását megkönnyíti a pTZ57R/T plazmid 3' végein lévő túlnyúló dideoxi-timidin (ddT) nukleotid.

Helyspecifikus mutagenézis

A helyspecifikus mutációkat a Kunkel és munkatársai által kidolgozott módszerrel hoztuk létre (Kunkel és mtsai, 1987). Az *E.coli* K1053 (=BW313) sejtek olyan mutáns baktérium sejtek, amelyek két enzim, az uracil-N-glükóziláz és a d-uracil-trifoszfátáz enzimekben mutánsak (ung^- , dut^-). A d-uracil-trifoszfátáz enzim hiánya azt eredményezi, hogy a sejtben a DNS szintézisekor timin bázis helyett uracil épülhet be. Az uracil-N-glükóziláz hiánya (ung^-) pedig képtelenné teszi a sejtet arra, hogy a szintézis során a DNS-be már beépült uracilt eltávolítsa. Így ha a tápfolyadékot uracillal egészítjük ki, akkor a szintézis során a DNS-be timin helyett uracil épül be. A helyspecifikus mutációt hordozó primer oligonukleotidot az egyesszálú, uracilt tartalmazó DNS templáthoz hibridizáltatjuk, majd *in vitro* megszintetizáljuk a második szálát. Ha az *in vitro* szintetizált DNS-t ung^+ típusú sejtekbe juttatjuk be, csak a mutációt hordozó szál fog replikálódni, a templátként használt uracilos szál az uracil-N-glükóziláz működése következtében eliminálódik.

A pBluescript SKII(+) alapú fágmid DNS-sel transzformált *E. coli* K1053 sejteket 50 ml LB táptalajban 100 µg/ml ampicillinnel és 0,25 µg/ml uracillal kiegészítve 37 °C-on OD $\approx$ 0,2-0,3 denzitásig tenyésztettük, majd 30-50-szeres multiplicitás mellett f1 R176 fággal fertőztük. Az f1 R176 fág a segédfág

szerepét töltötte be, annak érdekében, hogy az egyesszálú fágmid DNS képződjön és ez a szintetizálódó fágfehérjékkel együtt fágreszecsskéket képezzen. További 5 órás ráztatás után a sejteket centrifugálással üleptítettük (8000 rpm, 15 perc, 4 °C).

Az uracilt tartalmazó egyesszálú fágmid DNS-eket a már említett PEG-es módszerrel tisztítottuk, majd fenol-kloroformos kirázás után alkohollal kicsaptuk. A komplementer DNS szál *in vitro* szintézisét a következőképpen végeztük: a T4 polinukleotid kinázzal foszforilált, mutációt hordozó oligonukleotidot (20 pmol) és a 0,5-1 µg uracilt tartalmazó egyesszálú fágmid DNS-t 90-95 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd az elegyet lassan szobahőmérsékletre hűtöttük. A második szál szintézisét 4 °C-on kezdtük 5 percig, majd a további szintézis 37 °C-on történt 2,5 órán keresztül. A reakcióelegy a következőket tartalmazta: uracilos egyesszálú DNS templát/primer, 50 mM NaCl, 500 µM dNTP mix, 1 mM ATP, 40 mM Tris-HCl pH 5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml marhaszérumalbumin, 5 egység T4 DNS polimeráz és 5 egység T4 DNS ligáz. A szintézis után a DNS-t *E.coli* XLBlue MRF' Kan^r (ung⁺ dut⁺) sejtekbe transzformáltuk, majd ampicillinre rezisztens klónokat szelektáltunk.

A fúziós SssI metiltranszferázok túltermelése

A pFLAG-MAC plazmid alapú fúziós metiltranszferáz variánsok túltermeltetéséhez a sejteket OD₆₀₀≈0,5-0,6 denzitásig növesztettük LB tápfolyadékban, majd a MTáz termelést 0,5-1 mM IPTG-vel indukáltuk. A tenyésztést a továbbiakban 30 °C-on folytattuk 4 órán keresztül.

A pBAD24 vektor alapú M.SssI variánsok túltermelését a következő módon oldottuk meg: A metiláz variánsokat termelő *E.coli* ER1821 sejteket 200 ml LB-ben 37 °C-on OD 0,5-0,6-ig növesztettük, majd a tápfolyadékba az *araBAD* promóter indukálása érdekében 0,5-1 % arabinózt tettünk. A sejteket

további 4 órán keresztül 30°C-on ráztuk. A ráztatás után a sejteket centrifugálással üleptítettük (8000 rpm, 4 °C, 20 perc).

Sejtextraktum készítése

A tenyésztést általában LB táptalajban végeztük, majd az indukciós periódus után a sejteket centrifugálással üleptítettük. A lecentrifugált sejteket 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM 2-merkaptoetanol, 1 mM EDTA oldatban szuszpendáltuk, majd ultrahagos kezeléssel feltártuk. A sejttörmeléket centrifugálással eltávolítottuk (18000 rpm, 4 °C, 30 perc).

Az SssI-6xHis metiltranszferáz tisztítása heparin-agaróz oszlopkromatográfiával

Az ER1821 (pBH-MSssI) sejteket a centrifugálást követően 10 ml feltáró pufferben vettük fel (20 mM Tris HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -merkaptoetanol), majd ultrahagos kezelésnek tettük ki (10 x 30 másodperc). A sejttörmeléket centrifugálással távolítottuk el (4°C, 18000 rpm, 30 perc). A felülúszót egy 30 ml-es heparin-agaróz oszlopon folytattuk át, amelyet előzőleg az oszlop-pufferrel (20 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5% glicerín) ekvibráltunk. Az oszlopot a továbbiakban 5 térfogatnyi oszlop-pufferrel mostuk, majd a felkötődött M.Sss-6xHis enzimet 50 mM-1 M NaCl grádienssel (oszlop-pufferben) eluáltuk.

A fúziós metiltranszferázok tisztítása

A fúziós metiltranszferázok tisztítását a fúziós partner tisztítására javasolt affinitásoszlopok protokolljai szerint végeztük. A FLAG-MSss enzimvariánsokat ANTI-FLAG M2 affinitásoszlopon tisztítottuk, a MTázt az

oszlopról FLAG oktapeptiddel eluáltuk. A 6xHis affinitásfarokkal rendelkező variánsokat Ni-agaróz affinitásoszlopon tisztítottuk. A MTázokat az oszlopról 250 mM-1M imidazol grádiens oldattal eluáltuk.

Metiltranszferáz aktivitás mérése

Az aktivitásmérést a következő reakcióelegyben (30 μ l) végeztük: 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 10 mM ditiotritol, 1 μ g λ DNS, 5 μ M [metil- 3 H] S-adenozil-L-metionin (111 GBq/mmol) és 2 μ l nyers sejtkivonat, vagy tisztított enzim. 20 perc 37 °C-on történő inkubáció után az enzimet 4 μ l 10 %-os SDS-sel inaktiváltuk, majd a reakcióelegyet DE81 papírkorongra pipettáztuk. A korongokat háromszor 50 mM Na_2HPO_4 -el, majd kétszer 95 %-os etanollal mostuk, majd megszáritottuk. A beépült 3 H aktivitást folyadékszintillációs készülékkel mértük.

Az eredmények értékelésénél felhasznált matematikai összefüggések

A DNS-görbítés mértékét a Ferrari és mtsai. (Ferrari és mtsai., 1992) által kidolgozott módszerrel határoztuk meg. E szerint, ha az egyes komplexek relatív mobilitását a fehérje felismerőhelyének fragmentumon belüli pozíciójának függvényében ábrázoljuk, a kapott pontokra parabolát illeszthetünk. A parabola egyenletéből ($y=ax^2+bx+c$), a következő összefüggés alapján meg tudjuk határozni a DNS-görbítés szögét: $\underline{a}$ vagy $\underline{-b}=2c(1+\cos\theta)$. Az $\underline{a}$, $\underline{b}$ és $\underline{c}$ paraméterek a másodfokú egyenlet együtthatói és $\theta=180^\circ-\alpha$, ahol α a görbítés szöge.

A dolgozatban említett oligonukleotidok

1. táblázat

név	szekvencia (5'→3')	felhasználás
bend1	GAATTCACGCGTAG	pBend-plazmidok
bend2	AAGCTTGGATCCC	pBend-plazmidok
AK29	GAATTCACGCGTAGATCTG	pBend-plazmidok
AK30	AAGCTTGGATCCCTCGATT	pBend-plazmidok
<i>Apa</i> I linker	GGGGCCCC	pBend-GGCC készítése
<i>Pst</i> I linker	GCTGCAGC	pBend-GGCC készítése
AK12	TCGCGAAGG ^{m5} CCTCCCG	phasing analízis
M13/pUC	GTAAAACGACGGCCAGT	phasing analízis
AK27	CTAGCAGGACCTG	pBend-GGWCC készítése
AK28	CTAGCAGGTCCTG	pBend-GGWCC készítése
AK11	CTAGCAGCGCTG	pBend-GCGC készítése
AK32	CTAGCACCGGTG	pBend-CCGG készítése
AK68	TATTGACAAGTATTAACATCCAATTTTATCTAT	pBS-CAL72 készítése
AK62	GATATTGAATTTCCAGCAACAAATATTTTTTGA	pBS-CAL71 készítése
AK70	GATCCACGTGCATGAGCAAAGTAGAAAATAAAAC	pTZ-Sss1 készítése
AK71	GGCCAGATCTTTAACCTCCAATTTTATCTAT	pTZ-Sss1 készítése
AK80	AACATATTCATTTCTAGTCAAGACTTATCTCA	pBS-Sss13 készítése
AK83	GTACCGTCGACATGGACTACAAGGACGACGATGACAA	pTZ-Sss3 készítése
AK84	TTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCATGTCGACG	pTZ-Sss3 készítése
AK86	ATCTTTTATTGACAAGTGTTAACCTCCAATTTT	pBS-CAL75 készítése
AK87	CTCATCACCATCACCATCACTGCTAACTGCA	pBS-CAL76 készítése
AK88	GTTAGCAGTGATGGTCATGGTGATGAG	pBS-CAL76 készítése
AK91	GGGATCCCATATGTGCAAAGTAGAAAATAAAACAAAAA	pTZ-Sss7 készítése

Eredmények

A C5-citozin metiltranszferázok által kiváltott DNS görbület

A *Bsp*RI metiltranszferáz footprint analízise (Finta és mtsai. 1997) kapcsán az a hipotézis merült fel, hogy az enzim a metilációs folyamat során a DNS-ben torzulást hoz létre. Ezért megvizsgáltuk, hogy az enzim a specifikus komplex kialakításakor okoz-e görbületet a DNS-ben. Létrehoztunk egy plazmidot, amelynek a polilinker része alkalmas permutációs gélretardációhoz szükséges fragmentumok előállítására. Később más specifitású C5-citozin metilázokat is bevontunk a vizsgálatokba, amelyek további plazmidok elkészítését igényelték.

A permutált szerkezetű fragmentumok előállítása

A munka során létrehozott plazmidkonstrukciók a pBend2 plazmid (Kim és mtsai., 1989) változatai (6.ábra). A pBend2 plazmid *Eco*RI-*Hind*III helyek által határolt polilinker részét, amely restrikciós endonukleázok tandem ismétlődő felismerőhelyeit hordozza, ültettük át pUC18 vektorba (Norlander és mtsai., 1983). Az így létrejövő pBend6 plazmidot a továbbiakban úgy módosítottuk, hogy az általunk vizsgálni kívánt metiltranszferáz felismerőhelyét a két polilinker fél között elhelyezkedő *Xba*I helybe építettük. Azoknál a konstrukcióknál, amelyek polilinker részei már eredetileg is tartalmazták a metiltranszferáz felismerőhelyét úgy módosítottuk, hogy az eredeti felismerőhelyeket linkerek beépítésével megszüntettük. A munka során létrehozott plazmidok polilinker szekvenciáit az 6.ábrán tüntettük fel. A pBend6 plazmid polilinker részében található két *Stu*I helyben lévő *Bsp*RI felismerőhelyet *Pst*I linkerek beépítésével szüntettük meg. A későbbi szekvenciameghatározás mutatta csak meg, hogy az egyik linker beépülése folyamán 2 bázispár eliminálódott. Ezt a deléciót a kísérletek eredményeinek

értékelésénél figyelembe vettük. Annak érdekében, hogy egyedi *BspRI* felismerőhelyet hozzunk létre a polilinker részben, a Klenow enzimmel feltöltött *XbaI* helyre egy *ApaI* linkert építettünk (pBend-GGCC). Az *ApaI* linker szekvenciája (GGGGCCCC) miatt a pBend-GGCC plazmid GGSCC helyet tartalmazó (S = C vagy G) fragmentumsorozat előállítására is alkalmas volt.

A pBend-GGWCC plazmidot a pBend6 *XbaI* helyére történő, az AK27 és AK28 részlegesen komplementer kettősszálú oligonukleotidok beépítésével hoztuk létre. A ligálást az AK27/AK28 oligonukleotid egyesszálú *XbaI* túlnyúló végei segítették.

A pBend-GCGC plazmidot a pBend6 plazmidból hoztuk létre úgy, hogy az *XbaI* helyre beépítettük az önmagával részlegesen komplementer AK11 oligonukleotidot.

A pBend-CCGG plazmid készítéséhez a polilinkerben lévő két *SmaI* helybe (CCCGGG) egy-egy *PstI* linkert építettünk be. Ezt követően az *XbaI* helybe egy önmagával részlegesen komplementer oligonukleotidból (AK32) létrehozott duplexet ligáltunk.

A plazmidkonstrukciók polilinker részét DNS szekvencia-meghatározással ellenőriztük.

A kísérletekhez szükséges permutált fragmentumokat polimeráz láncreakcióval, a pBend plazmidokat templátként használva, majd a PCR termék restrikciós endonukleáz hasításával állítottuk elő (lásd anyagok és módszerek) (6.ábra).

Gélelektroforetikus mobilitás vizsgálata cirkulárisan permutált fragmentumokkal

A *BspRI* metiltranszferáz a felismerőhelyét tartalmazó kettősszálú, modifikálatlan DNS-sel specifikus komplexet alkotott. A kialakult komplexek specifikusságának bizonyítéka, hogy a metiltranszferáz csak a felismerőhelyét

tartalmazó fragmentumokkal képzett komplexet, a felismerőhelyét nem hordozó fragmentumokkal nem. A gélretardációs kísérletekben a *Bsp*RI metiltranszferáz-DNS komplex kialakulását a homocisztein nagy mértékben elősegítette. A homocisztein a metilációs reakció végterméke és egyben az enzimatis reakció általánosan használt kompetítora. A homocisztein az M.*Bsp*RI-DNS komplex stabilitását is nagy mértékben megnövelte. Ha a gél nem tartalmazott homociszteint, akkor a komplex az elektroforézis során nagy mértékben disszociált, a képe így az autoradiogramon diffúzzá vált.

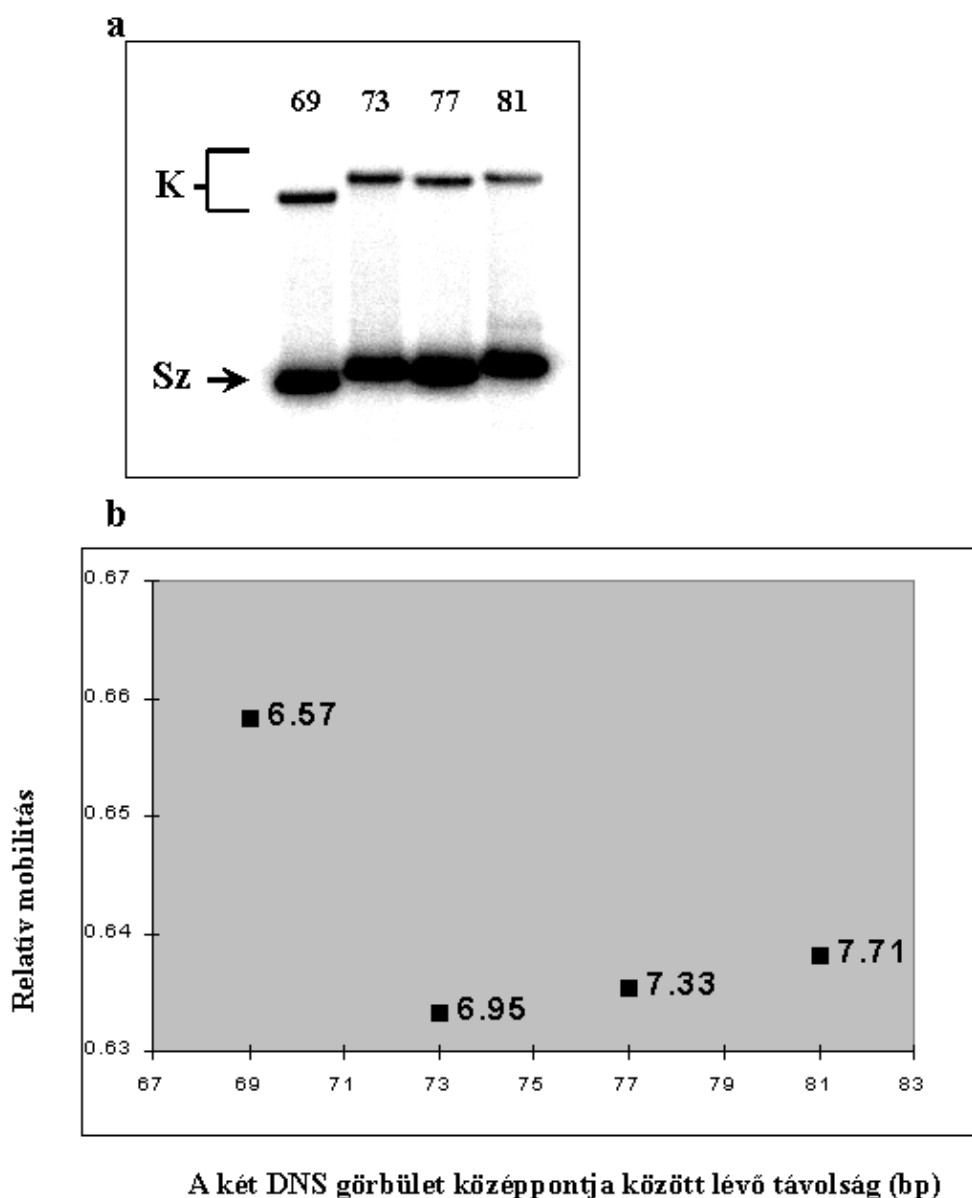
Metilálatlan DNS-fragmentumokat használva, a *Bsp*RI metiltranszferáz-DNS komplexek mobilitásából DNS görbítésre következtethettünk (8.ábra). Az autoradiogrammon megfigyelhető, hogy a komplexek mobilitását a fragmentumban elhelyezkedő *Bsp*RI felismerőhely pozíciója határozza meg. Ahogy a felismerőhely a fragmentum közepe felé tolódik el, a komplex mobilitása úgy csökken. A DNS hajlítás mértékét a Ferrari és munkatársai (Ferrari és mtsai., 1992) által közölt módszerrel számítottuk ki (anyagok és módszerek). Ezzel az egyenlettel számolva 46-50°-os görbítési szöget kaptunk (2.táblázat). Mivel a *Hae*III és a *Bsp*RI metiltranszferáz azonos specificitással rendelkezik, és primer szerkezetük nagy hasonlóságot mutat, feltételezhető, hogy a DNS felismerésük is hasonló módon történik. Ezért a *Hae*III metiltranszferáz röntgendiffrakciós modelljének tükrében, ahol a DNS nincs meggömbülve, ez az eredmény igen meglepő volt. Az ellentmondást tisztázandó, a *Hae*III metiltranszferázzal is permutációs gélretardációs kísérletet végeztünk. A kísérletek eredményei 40-43°-os DNS görbítésre engedtek következtetni (8.ábra).

A meglepő eredmények miatt további bizonyítékokat szeretnénk volna szerezni annak igazolására, hogy a két enzim a DNS felismerése során DNS görbítést indukál. Ennek érdekében a két metiltranszferázt “phasing” analízisnek vetettük alá. A kísérletekhez olyan radioaktívan jelölt DNS fragmentumokat hoztunk létre, amelyekben a GGCC felismerőhely különböző távolságra volt egy

ismert mértékű és irányú DNS görbületet létrehozó *poli-A/T* szakasztól. Így a DNS helikális szerkezete miatt változott a két görbület egymáshoz viszonyított iránya is. A kísérletek tervezésénél figyelembe kellett vennünk azt a tényt, hogy a metiltranszferázok a kettősszalú metilálatlan DNS-hez kétféle orientációban képesek kötődni. Az így kialakult két fehérje-DNS komplex a görbítés irányának meghatározása szempontjából nem ekvivalens egymással. Annak érdekében, hogy csak egyfajta orientáció jöhessen létre, a phasing analízishez hemimetilált GGCC felismerőhelyet tartalmazó DNS fragmentumokat készítettünk (anyagok és módszerek). A legkisebb relatív mobilitással az a komplex rendelkezett, amelyben a két görbület középpontja közti távolság 73 bázispár volt, amely B-DNS-re vonatkoztatva kb 7 helikális fordulatnak felel meg. A legnagyobb relatív mobilitású komplexnek az bizonyult, ahol a fragmentumban a két görbület távolsága 69 bp volt, amely kb 6,5 helikális fordulatot jelent. Tudtuk, hogy a *poli-A/T* szakasz a DNS kisárka felé görbíti a DNS-t. Mivel a legkisebb relatív mobilitással az a komplex rendelkezett, amelyben a két görbület között lévő távolság közel 7 helikális fordulatnyi és a legnagyobb relatív mobilitással az, ahol a távolság 6,5 helikális fordulatnyi, arra következtettünk, hogy az előbbi komplexben a két DNS görbület azonos, míg az utóbbi komplexben a két görbület ellentétes irányban helyezkedett el. Ez azt jelentette, hogy mind a *BspRI*, mind a *HaeIII* metiltranszferáz a DNS kisárka felé görbítette meg a DNS-t (9.ábra).

Az eredményeink és a *HaeIII* metiltranszferáz röntgendiffrakciós modellje közötti ellentmondás egy lehetséges magyarázata az lehet, hogy a permutációs gélretardációs kísérletekben a MTáz-DNS komplexet a metilációs folyamat kezdeti lépéseiben vizsgáljuk, míg a kristályszerkezeti modell a metilcsoport átvitele utáni állapotról készült. Lehetséges, hogy a metilációs folyamat kezdetén az enzim a DNS-ben görbületet indukál, melynek szerepe lehet a felismerésben és báziskifordulásban (base flipping), majd a folyamat végén a DNS visszanyeri az eredeti torzulatlan formáját. Annak érdekében, hogy

ezt az elképzelést megvizsgáljuk, a *HaeIII* MTázzal mindkét szálon metilált DNS fragmentumokkal permutációs gélretardációt végeztünk (anyagok és módszerek). Ezek a kísérletek 32-33°-os DNS görbítést mutattak ki (8.ábra).



9.ábra. a: A *HaeIII* metiltranszferáz-DNS komplex phasing analízise (K-komplex, Sz-szabad DNS fragmentum) autoradiogramm. b: Az egyes komplexek relatív mobilitása a DNS fragmentumban lévő két görbület közti távolság függvényében. Az adatok azt mutatják, hogy az egyes komplexekben a két görbület között lévő távolság hány-szoros helikális fordulatnak felel meg.

A *HaeIII* MTáz-DNS komplex kristályszerkezeti modelljének látszólag ellentmondó megfigyeléseink miatt felmerült bennünk a gyanú, hogy eredményeink talán valamiféle kísérleti műtermékek, amelyek a vizsgálati módszer hibájára vezethetők vissza. Ezért bevontuk a vizsgálatainkba a jól jellemzett *HhaI* MTázt is. Az irodalomból ismertük, hogy ez a MTáz permutációs kísérletekben nem, míg elektromikroszkópos vizsgálatok során is csak csekély mértékű ($11-13^\circ$) DNS görbítést mutatott (Garcia és mtsai., 1996). A pBend-GCGC plazmid felhasználásával elkészített permutált fragmentumok segítségével a *HhaI* MTázzal gélretardációt végeztünk. A gélretardáció eredményei összhangban álltak a fent említett szerzők adataival. Kísérleteinkben *HhaI* MTáz igen csekély mértékben, $10-15^\circ$ -ben görbítette meg a DNS-t (8.ábra). Ezek az adatok azt jelezték, hogy a *HaeIII* és a *BspRI* metiltranszferázokkal kapott eredményeink megbízhatóak.

Kutatásainkat további három C5-MTázra is kiterjesztettük. Választásunk azért esett a *SinI* és a *Sau96I* (felismerőszekvenciája GGWCC, a metilált citozin aláhúzva, illetve GGNCC) MTázokra, mert a felismerőszekvenciájuk hasonló a *BspRI* és a *HaeIII* metilázokéhoz. A *HpaII* MTáz (CCGG) vizsgálatát azért tartottuk fontosnak, mert a felismerőszekvenciája megegyezik az *MspI* metilázéval, melyről ismert volt, hogy igen nagy mértékű DNS-görbületet (140°) indukál (Dubey és mtsai., 1997). Eddigi eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a DNS görbítés mértéke attól függ, hogy milyen bázis követi a metilálandó citozint. Ezért érdekesnek tűnt a *HpaII* MTáz bevonása ebbe a munkába, mert a *M.HpaII* az *M.MspI*-től eltérően a belső citozint metilálja, így a metilált citozin után (3' irányban) más bázis van. A *SinI* MTáz vizsgálatára a pBend-GGWCC, míg a *HpaII* MTáz vizsgálatára a pBend-CCGG plazmidot hoztuk létre. A *Sau96I* metiláz kétféle szekvenciát is képes felismerni: GG^A/TCC, illetve a GG^G/C^CCC-t. A GG^A/TCC felismerőszekvenciát tartalmazó permutált fragmentumokat a pBend-GGWCC plazmid, míg a GG^G/C^CCC

felismerőszekvenciát hordozó fragmentumokat a pBend-GGCC plazmid segítségével készítettük el (6.ábra).

Mindhárom MTáz esetében ki tudtunk mutatni a DNS görbítést (10.ábra). Az *M.HpaII* esetében 30°-os, az *M.SinI*-esetében 34-37°-os görbítést mértünk. A *Sau96I* MTáz mind az A/T, mind a G/C közepű felismerőhelyet tartalmazó DNS fragmentumot képes volt 52-57°-os szögben meggörbíteni. Talán a legérdekesebb eredmény a *HpaII* (30°) és az *MspI* (140°) metiláz közötti különbség (2.táblázat).

MT-áz	felismerő-hely	A felismerőhelyben történő szerkezeti változás	DNS görbítés	OH footprint eltolódása	Hivatkozás
<i>HhaI</i>	G <u>C</u> GC	báziskifordulás	2,13°	5'	Klimasauskas, 1994; Garcia, 1996; ez a munka
<i>SssI</i>	<u>C</u> G	?	?	5'	Renbaum, 1995
<i>HpaII</i>	C <u>C</u> GG	?	30 °	?	ez a munka
<i>HaeIII</i>	GG <u>C</u> C	báziskifordulás és átrendeződés	40-43 °	?	Reinisch, 1995; ez a munka
<i>BspRI</i>	GG <u>C</u> C	?	46-50 °	3'	Finta, 1997; ez a munka
<i>SinI</i>	GG ^A / <u>T</u> CC	?	34-37 °	?	ez a munka
<i>Sau96I</i>	GG ^A / <u>T</u> CC	?	52-57 °	?	ez a munka
<i>Sau96I</i>	GG ^G / <u>C</u> CC	?	53-57 °	?	ez a munka
<i>MspI</i>	<u>C</u> CGG	?	130-140 °	3'	Dubey, 1997

2.táblázat. Az eddig vizsgált metiltranszferázok felismerőkomplexeinek néhány kiemelt tulajdonsága.

Az SssI metiltranszferáz átalakítása oligonukleotidokhoz és PNA-hoz való kapcsolás céljából

A klónozási folyamatok során számos előre nem várt problémával kellett szembenéznünk, amelyeket az egyes lépésekből, illetve stratégiákból szerzett tapasztalatok felhasználásával igyekeztünk megoldani.

pCAL7-alapú konstrukciók

A munka első fázisában úgy terveztük, hogy a keresztkötési reakcióhoz szükséges feltételeket a pCAL7 plazmidon lévő SssI metiltranszferáz génjének módosításával fogjuk elérni. Úgy gondoltuk, hogy a követelményeknek megfelelő módosítások után erről a plazmidról fogjuk túltermeltetni az egyes variáns típusokat. A New England Biolabs cég a pCAL7 plazmidot használja az SssI metiltranszferáz előállítására. A pCAL7 plazmid egy pBR322 alapú plazmid, amely az M.SssI gént tartalmazza. A metiltranszferáz átíródása a P_{tac} promóter kontrollja alatt áll. A *Spiroplasma* kodonhasználata eltér az *E.coli* kodonhasználatától. A vad típusú sssIM génben 4 TGA (W43, W83, W165, W203) kodon van, amely a *Spiroplasmában* triptofánt kódol. A TGA triplet *E.coli*-ban stop kodont jelent, ezért eredetileg a klónozott sssIM kifejeződését csak egy szupresszor tRNS-t szintetizáló törzsben lehetett elérni. A könnyebb kezelhetőség érdekében a New England Biolabs cég ezeket a kodonokat az *E.coliban* is triptofánt jelentő TGG-re módosította. A pCAL7 plazmidból készített származékok szekvenciameghatározásakor egy további mutációt is felfedeztünk, amely aminosavcserét is eredményezett (I343M). Mint utóbb kiderült, ez a mutáció jelen volt a pCAL7 plazmidban is. Ennek a mutációnak az eredetét nem sikerült kiderítenünk, ezért feltételezhető, hogy az eredeti közleményben (Renbaum és mtsai., 1990) közölt szekvencia hibás.

Gly386Cys mutáns előállítása pCAL7-alapú plazmidban

A Gly386Cys mutáció létrehozása annak érdekében történt, hogy az SssI MTázban C-terminális helyzetben létrehozzunk egy végálló ciszteint. Ezt a metiláz variánst a heterobifunkcionális keresztkötési reakcióban lehetne használni. Az sssIM gén átalakítása érdekében a pCAL7 plazmid 938 bp SacI-KpnI fragmentumát átklónoztuk pBluescriptSKII+ fágmidba. Az így kapott pBS-CAL71 plazmidon AK68 mutagén oligonukleotid felhasználásával helyspecifikus mutációt hoztunk létre. A mutáns pBS-CAL72 plazmid SacI-KpnI fragmentumát visszaültettük pCAL7 plazmidba. Az így létrejött új plazmidot pCAL7-72-nek neveztük el (11.ábra).

Cys368Ala mutáns előállítása pCAL7-alapú plazmidban

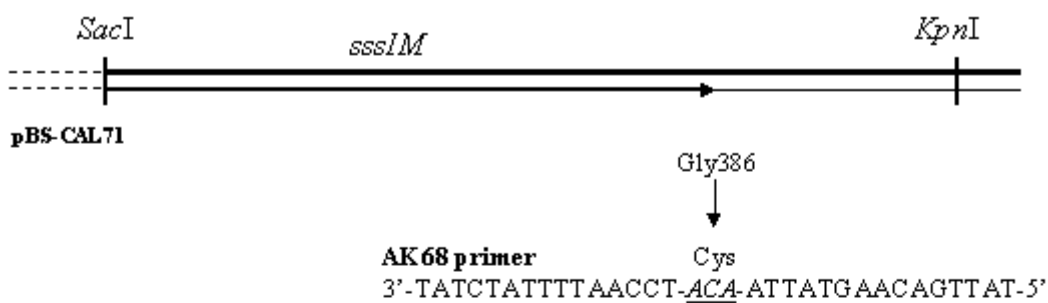
A kémiai keresztkötési reakció feltétele, hogy az N vagy C terminális cisztein mellett további reaktív ciszteint ne tartalmazzon a fehérje. Ennek érdekében a Cys368 aminosavat alaninra cseréltük. A helyspecifikus mutagenezist a pBS-CAL71 plazmidon végeztük az AK62 mutagén oligonukleotid segítségével (11.ábra). Az így kapott mutáns pBS-CAL73 plazmid SacI-KpnI fragmentumát visszaültettük pCAL7 plazmidba. Az új plazmid a pCAL7-73 nevet kapta.

Cys368Ala + Gly386Cys kettős mutáns előállítása pCAL7-alapú plazmidban

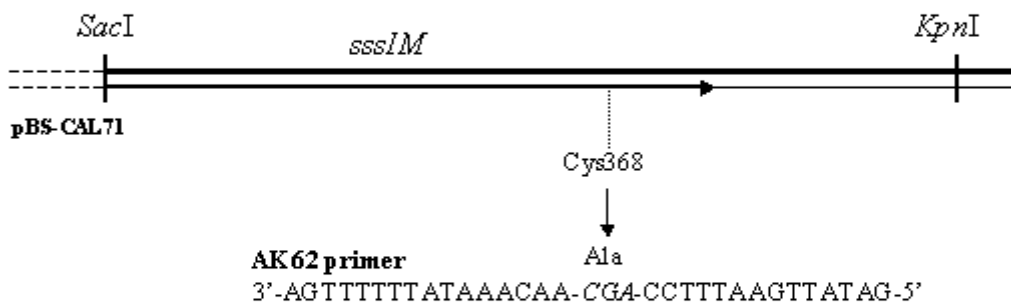
Annak érdekében, hogy megfeleljünk a fent említett két feltételnek (C-terminális cisztein, további reaktív cisztein hiánya), olyan variánst hoztunk létre, amely mindkét mutációt tartalmazta (Cys368Ala + Gly386Cys). Ezért a helyspecifikus mutagenézist (Cys368Ala) a pBS-CAL72 plazmidon AK62 mutagén oligonukleotiddal készítettük el (11.ábra). A kettős mutációt hordozó pBS-CAL74 plazmid *SacI-KpnI* fragmentumát visszaültettük a pCAL7-be. Az új plazmidnak a pCAL7-74 nevet adtuk.

Annak ellenére, hogy a pCAL7 alapú konstrukciók aktív metiltranszferáz géneket hordoztak, nem váltották be a hozzájuk fűzött reményeket, mert nem sikerült a variánsokat túltermeltetni és hagyományos módszerekkel (P11 foszfocellulóz-, heparin agaróz-oszlopok) a kívánt mértékben tisztítani. Ezért úgy döntöttünk, hogy a munkát ezekkel a variánsokkal nem folytatjuk tovább. A munka ezen fázisának kudarca rávilágított arra, hogy a homogenitásig történő tisztítást csakis fúziós fehérje partnerrel ellátott variánsokkal leszünk képesek megoldani. Ezért figyelmünket olyan fehérjetúltermelésre alkalmas plazmidkonstrukciók felé irányítottuk, amelyek lehetővé teszik fúziós fehérjék előállítását.

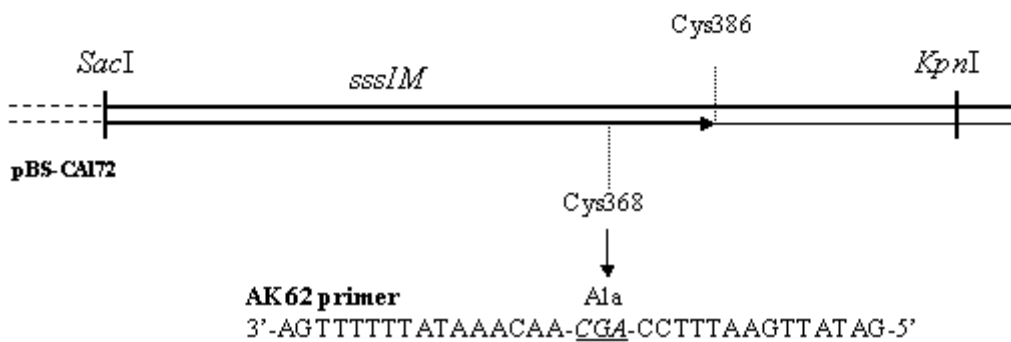
pBS-Cal72 (Gly386Cys)



pBS-CAL73 (Cys368Ala)



pBS-CAL74 (Cys368Ala + Gly386Cys)

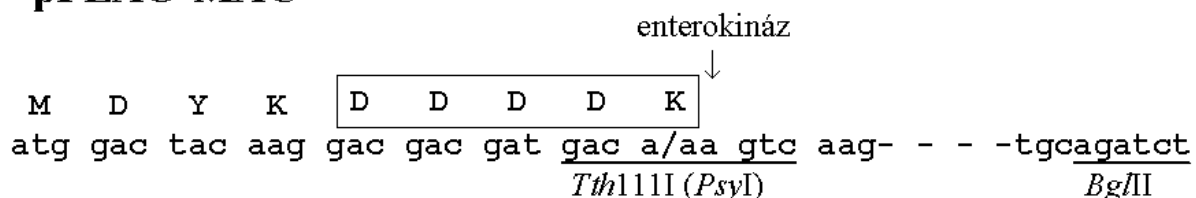


11.ábra. A Gly386Cys és a Cys368Ala aminosavcserék létrehozása helyspecifikus mutagenezissel.

A pFLAG-MAC plazmid alapú FLAG-M.SssI variáns előállítása

Miután a pCAL7 plazmid-alapú variánsokat nem tudtuk a szükséges mennyiségben tisztítani, ezért kísérletet tettünk a metiltranszferáz fúziós fehérjeként történő előállításra. Erre a célra először a Sigma cég által forgalmazott pFLAG-MAC fúziós plazmidot használtuk. A vektor a FLAG oktapeptidet (DYKDDDDK) kódolja, amely magába foglalja az enterokináz felismerőhelyét (DDDDK).

pFLAG-MAC



A fúziós fehérje transzkripciója a P_{tac} promóter kontrollja alatt áll. A fúziós fehérjét FLAG peptid ellenanyagot tartalmazó affinitásoszlopon lehet tisztítani, majd a fúziós peptidrészt enterokinázzal proteolitikusan el lehet távolítani. Az SssI metiltranszferáz génjét a pCAL7 plazmidról, mint templárról PCR reakcióval amplifikáltuk AK70 és AK71 primerekkel (12.ábra), majd a terméket T/A klónozás segítségével plazmidba ültettük (anyagok és módszerek). Az így keletkező pTZ-Sss1 plazmidban az SssI gén iránya ellentétes volt a *lac* promóterrel induló transzkripcióval. Ez magyarázhatja az enzim gyenge kifejeződését, hiszen a plazmid *Hin*6I-gyel gyakorlatilag teljesen emésztődött. (A *Hin*6I endonukleáz az 5'-GCGC szekvenciát ismeri fel; az enzim hasítását a felismerőszekvenciában lévő belső citozin metilálásával blokkolni lehet.) A továbbiakban a pTZ-Sss1 plazmidból a klónozott fragmentumot *Eco*72I és *Bgl*II emésztéssel kivágtuk, majd *Psy*I endonukleázzal emésztett, Klenow enzim

segítségével feltöltött, ezt követően *Bgl*II-vel emésztett pFLAG-MAC vektor DNS-hez ligáltuk. Az *Eco*72 hasítással (CAC/GTG) létrejött véget feltöltött *Psy*I véghez ligálva létrejön egy lizin kodon (AAG). Ez a kodon helyreállítja az enterokináz felismerőhelyét, így a proteáz hasítás után egy olyan SssI metiltranszferáz jön létre, amely N-terminálisan egy ciszteint hordoz.

5'-primer AK70

*Eco*72I

5'-GATCCCACG TGC ATG AGC AAA GTA GAA AAT AAA AC-3'

C M S K V E N K →

3'-primer AK71

*Bgl*II

5'-GGCCAGATCTT TAA CCT CCA ATT TTA TCT AT-3'

* G G I K D I ←

12. ábra. A pTZ-SssI plazmid előállításához felhasznált primerek illeszkedése a SssI gén 5' és 3' végeihez.

Számos próbálkozás után sem sikerült a kívánt plazmidkonstrukciót előállítani. Az izolált plazmid DNS-ek annyiban különböztek a tervezett pFLAG-MSssI plazmidtól, hogy egy nukleotid hiányzott azon a helyen, ahol a két fragmentum ligálódott, emiatt a fúzió sem jöhetett létre a FLAG peptid szekvenciával. Az így pFLAG-M.SssIΔ1-nek nevezett plazmidok azonban metiláltak voltak és nyers kivonatban jelentős aktivitást mutattak. A transzláció feltehetően az eredeti M.SssI startkodonról indult. Valószínű, hogy *in vitro* a kívánt plazmid szerkezet is létrejött, de azért nem sikerült megkapnunk végül a klónt, mert az nem volt életképes.

Cys141Ser katalitikusan inaktív mutáns előállítása pFLAG-alapú plazmidban

Egy katalitikusan inaktív mutáns létrehozását azért tartottuk fontosnak, mert nem volt világos, hogy a már kész metiláz variánsokat miért nem voltunk képesek megfelelő mértékben túltermeltetni. Azt feltételeztük, hogy ennek oka a nagy metilációs aktivitás volt, amely a sejtek számára egy bizonyos szint után toxikussá vált. Megvizsgáltuk, hogy az SssI metiltranszferáz egy inaktív mutánsát lehet-e nagyobb mennyiségben termeltetni. A cél érdekében a pFLAG-MSssIΔ1 plazmid 753 bp-os *EcoRI* fragmentumát (13.ábra) pBluesckriptSSKII+ fágmidba klónoztuk olyan orientációban, hogy a fágban az antisense szál legyen. Ez a plazmid a pBS-Sss12 nevet kapta.

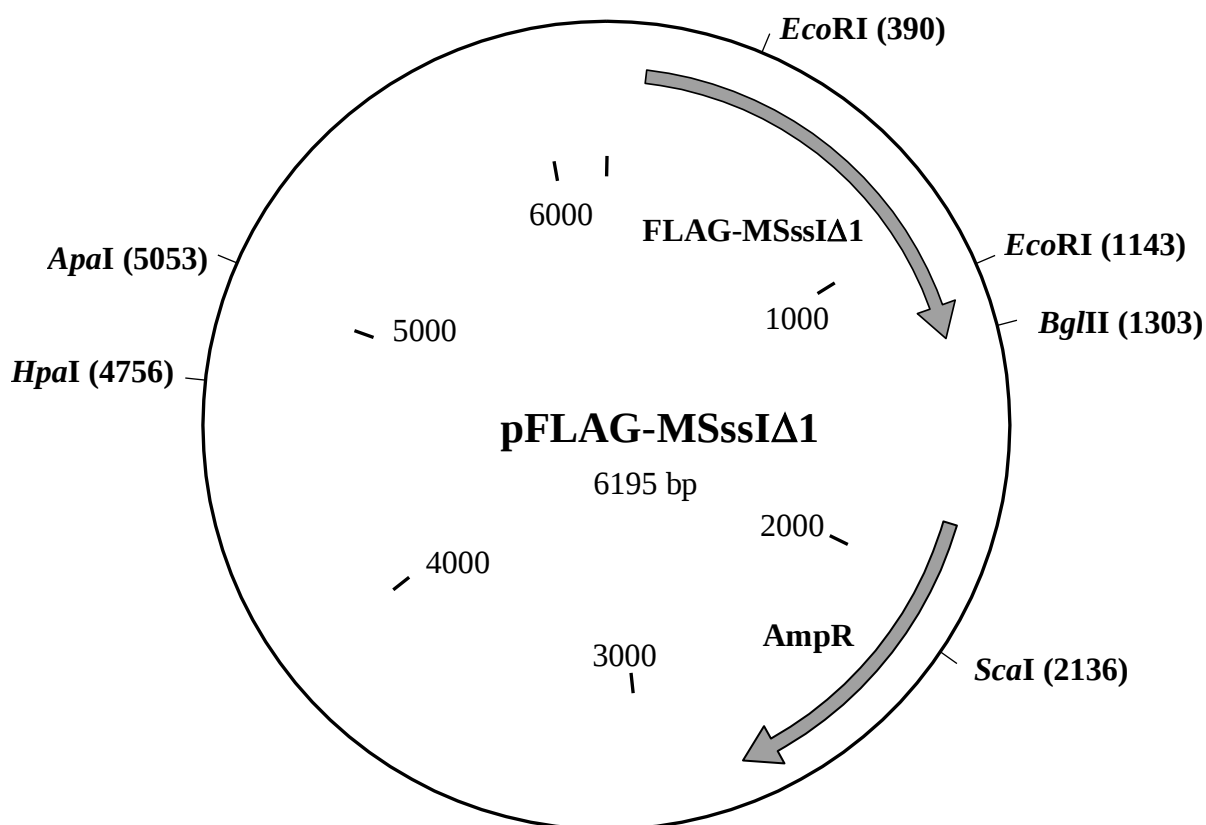
A mutagezist a már ismertett módszer alapján az AK80 mutagén oligonukleotiddal végeztük.

AK80 primer szekvenciája és a Cys141Ser mutáció:

Cys141→Ser
5'-AACATATTCATTTTCCT AGT CAAGACTTATCTCA-3'

A mutáns plazmidot pBS-Sss13-nek neveztük el. A (C141S) mutációt hordozó *EcoRI* fragmentumot visszaültettük pFLAG-MSssIΔ1-be, az új plazmid a pFLAG-MSssIC141S lett. A plazmid a vártan megfelelően nem volt metilált. Bár SDS-poliakrilamid gélen megjelent a várt méretű enzim, a C141S inaktív SssI metiltranszferáz túltermelése nem sikerült. Ugyanakkor gélen azt is megfigyelhettük, hogy a többi fehérje termelődése IPTG hozzáadása után visszaszorult. A jelenség lehetséges magyarázata lehet, hogy az inaktív mutáns metiltranszferáz is jelentős DNS kötésre volt képes, annak ellenére, hogy elvesztette a metilációs aktivitását. A toxikusság magyarázata az lehet, hogy az

SssI MTáz a DNS-hez való kötődésével gátolja a replikációt és a transzkripciót. Hasonló megfigyeléseket észleltek *EcoRII* és *HhaI* MTázoknál is, mikor a katalitikus ciszteint más aminosavakra cserélték (Wyszynski és mtsai., 1992, Mi, S. és Roberts, R.J., 1993).



13.ábra. A pFLAG-MSssIΔ1 plazmid szerkezete

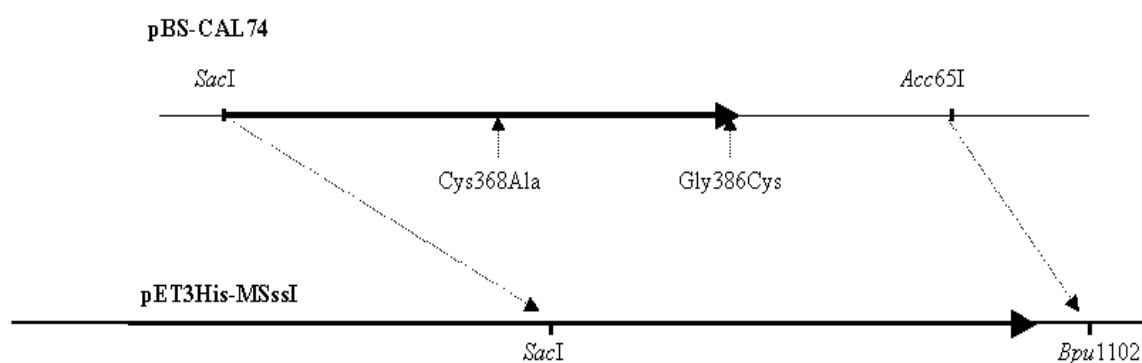
N-terminális 6xHis affinitásfarokkal ellátott variánsok előállítása

A pFLAG-MAC vektorral párhuzamosan kipróbáltuk a pETHis fúziós plazmidrendszert is (Chen és Hai, 1994). A pTZ-Sss1 plazmidot *Eco72I* és *BglII* endonukleázokkal hasítottuk. A kihasadt fragmentumot pET3His plazmid *XhoI*-

gyel emésztett, Klenow enzimmal feltöltött, majd a továbbiakban *Bam*HI-el hasított végeihez ligáltuk. Az így kapott pET3His-MSssI plazmidban a 6XHis affinitásfarok azonos leolvasási fázisba került a metiláz génjével.

M	H1	H2	H3	H4	H5	H6	L	E	C	M
ATG	CAT	CAC	CAT	CAC	CAT	CAC	<u>CTC</u>	<u>GAG</u>	TGC	ATG
							[<i>Xho</i> I]	[<i>Eco</i> 72I]		

A C368A+G386C cseréhez a pBS-CAL74 plazmidot *Acc*65I-el hasítottuk, majd a végeket Klenow enzimmal feltöltöttük. A továbbiakban a plazmidot *Sac*I endonukleázzal emésztettük, majd a tisztított fragmentumot a pET3His-MSssI plazmid *Bpu*1102I-el hasított, majd Klenow enzimmal feltöltött, továbbiakban *Sac*I-el emésztett nagy fragmentumához ligáltuk (14. ábra). A létrejött új plazmid neve pET3His-MSssI-74 lett.



14. ábra. A pET3His-MSssI-74 plazmid létrehozásához a pET3His-MSssI plazmid *Sac*I-*Bpu*1102 fragmentumát kicseréltük a pBS-CAL74 *Sac*I-*Acc*65I fragmentumára.

Az ER1821 törzsből izolált mindkét plazmid részleges védettséget mutatott *Hin*6I endonukleáz hasításával szemben. A Novagen cég által forgalmazott pET plazmidok az egyik legelterjedtebb expressziós

plazmidvektorok. A fehérjetermeltetést a T7 bakteriofág transzkripciósi rendszere irányítja *E.coli* sejtekben. A baktérium kromoszómájába épített T7 RNS polimeráz gén szelektív indukciója lehetővé teszi a pET-His plazmidon a T7 promóter kontrollja alatt lévő fúziós fehérje nagymértékű termelődését (Studier és mtsai., 1990).

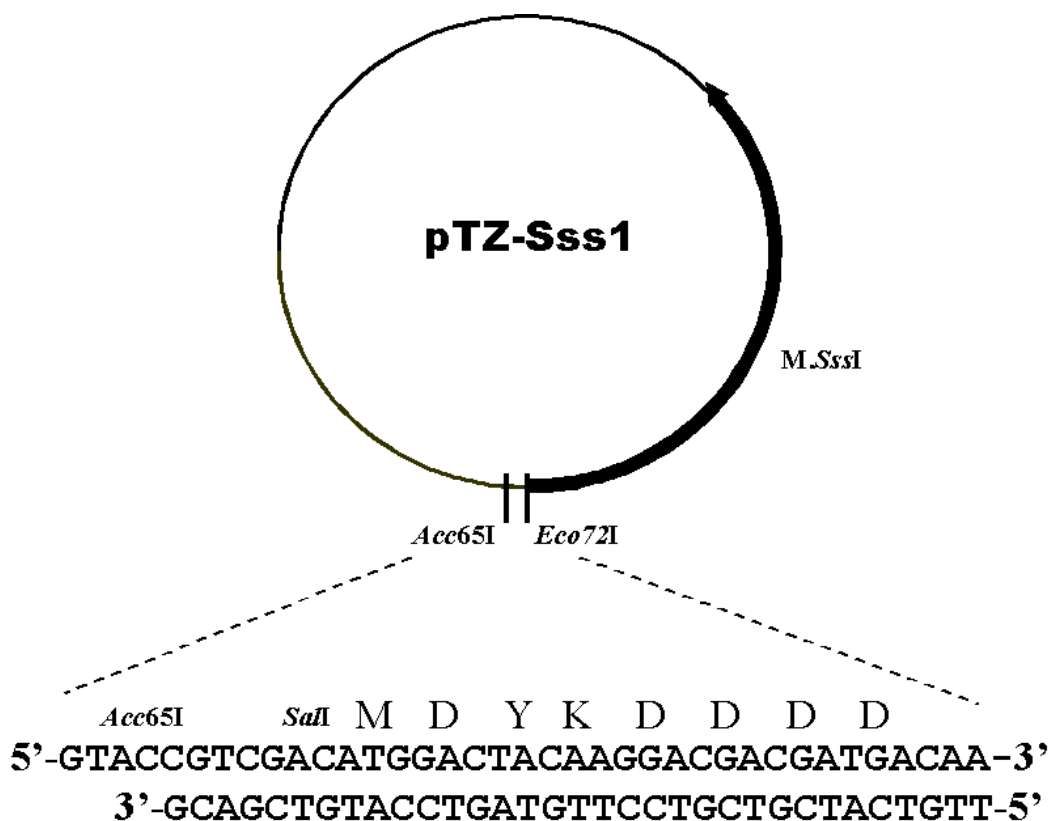
Mivel nem állt rendelkezésünkre olyan *E.coli* törzs, amely kromoszómája hordozza a T7 RNS polimeráz génjét és egyben genetikai háttere lehetővé teszi az SssI MTáz klónozását ($mcrBC^- mcrA^- mrr^-$), ezért a fúziós metiltranszferáz túltermelése érdekében a Novagen, DE3 Lysogenisation Kit segítségével készítettünk az *E.coli* ER1821 törzsből ($mcrBC^- mcrA^- mrr^-$) egy ER1821(DE3) lizogén törzset. Ez a törzs alkalmasnak látszott a fúziós metiltranszferáz túltermeletésére. Sajnos ezekbe a baktérium sejtekbe sem sikerült stabilan bevinni ezeket a plazmidokat, még akkor sem, ha a gazda a T7 polimeráz kifejeződését gátló pVH1(lacIq), illetve a T7 RNS polimeráz inhibitorát (lizozim) kódoló pLysE vagy pLysS plazmidokat tartalmazta (Moffat és Studier. 1987). Kizárólag akkor kaptunk jelentősebb mértékű M.SssI termelést, amikor az ER1821(pET3His-MSssI)-et sejteket a T7 RNS polimeráz génjét hordozó λ CE6 fággal fertőztünk. Az így elért M.SssI termelés is alacsony mértékűnek mutatkozott, ráadásul a módszer is nagyon nehézkes volt, mivel nem sikerült magas titerű λ CE6 fágot előállítani.

A pBAD24 vector alapú FLAG-M.SssI plazmid létrehozása

A tervezett FLAG-M.SssI fúziót a fenti módon nem sikerült létrehozni, ezért újabb próbálkozást tettünk a jól represszálható pBAD24 vektor felhasználásával. A pBAD24 plazmid egyike a toxikus fehérjék klónozására leggyakrabban alkalmazott expressziós vektoroknak. A klónozott gén transzkripciójáért az *araBAD* promóter a felelős. A plazmid azért alkalmas toxikus gének klónozására, mert az *araBAD* promóterről induló transzkripció szintje induktor (L-arabinóz) nélkül nagyon alacsony, és ez a szint glükóz hozzáadásával (katabolitrepresszió) tovább csökkenthető. A FLAG peptidet kódoló génszakaszt egy kettősszálú oligonukleotid (AK83/AK84) pTZ-Sss1 plazmidba ültetésével építettük az *sssIM* gén elé (15.ábra).

A két oligonukleotid hibridizálásával kapott részlegesen kétszálú duplexet az *Acc65I*-gyel és *Eco72I*-gyel emésztett pTZ-Sss1 plazmidba ligáltuk. Az oligoduplex ligálását az *Acc65I* 5' túlnyúló vég segítette. Az így kapott plazmidot pTZ-Sss3-nek neveztük el.

A pTZ-Sss3 plazmidból az *sssIM* gént *Acc65I*-*PstI* fragmentumon átklónoztuk a pBAD24 vektorba. Az így kapott plazmidban (pBFL-MSssI-1) a vektor iniciációs kodonja nem volt fázisban a FLAG-MSssI génnel. Erről a plazmidról LB+glükóz táptalajban nem volt jelentős kifejeződés, a plazmid csak részlegesen volt metilálva, míg 0.2 % arabinózt tartalmazó LB-táptalajban nőtt sejtekből preparált plazmid teljesen metilált volt.



15.ábra. A pTZ-Sss1 plazmid *Acc65I* és *Eco72I* helyekre beépített AK83/AK84 oligonukleotid által létrehozott szekvencia.

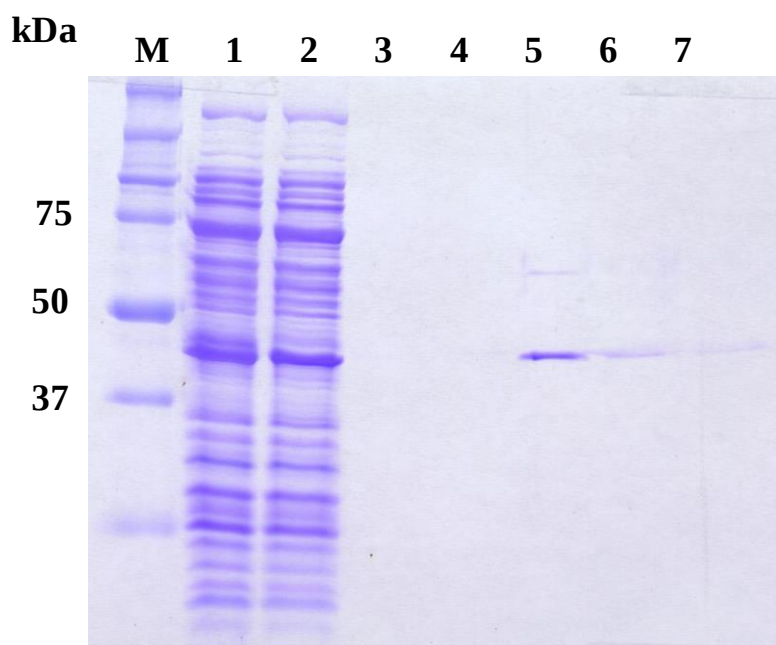
A FLAG-MSssI génnek a pBAD24 vektor ATG-jével azonos transzlációs fázisba hozásához a pBFL-MSssI-1 plazmidot *Acc65I* endonukleázzal emésztettük, majd a végeket feltöltöttük és a plazmidot újraligáltuk.

M	V	R	T	V	D	M
ATG	GTA	CGT	ACC	<u>GTC</u>	<u>GAC</u>	ATG
	[Acc		Acc]		SalI	

Már az LB+glükóz táptalajon nőtt sejtekből izolálható plazmid is részleges rezisztenciát mutatott *Hin6I* endonukleáz hasításával szemben, míg a

sejteket 0.2 % arabinózt tartalmazó LB táptalajban növesztve a plazmid teljesen metilált volt.

A pBS-CAL74 plazmid C368A+G386C kettős mutációt tartalmazó *SacI*-*PstI* fragmentumát a pBFL-MSssI-2 plazmid *SacI*+*PstI* hasítás után kapott nagy fragmentumához ligáltuk. Az így kapott klón a pBFL-MSssI-74 lett. A pBFL-MSssI-74 már glükóz tartalmú táptalajról preparálva is metilált volt, ami azt jelentette, hogy a kettős mutáns nagyobb aktivitást mutatott, mint a vad típus. Mindkét metiltranszferáz variáns túltermelését és homogenitásig történő tisztítását megoldottuk (16., 17. ábra).



16. ábra. A FLAG-M.SssI fúziós metiltranszferáz tisztítása Anti-Flag2-agaróz oszlopon. 1, ER1821(pBFL-MSssI-2) nyers sejtkivonat, 2, átfolyó, 3-7, elúciós frakciók FLAG szintetikus peptiddel (DYKDDDDK). M=protein molekulatömeg marker.

restrikciós helyet, amelyet a további klónozásnál ki tudtunk használni. A mutációt hordozó plazmid a pBS-CAL75 nevet kapta.

Annak érdekében, hogy olyan M.SssI variánst kapjunk, amely közvetlenül felhasználható a keresztkötési reakcióban, az *sssIM* gén C terminális végére egy 6xHis-Cys peptidet kódoló linkert építettünk be. A C-terminális 6xHis-Cys farok beépítését úgy oldottuk meg, hogy a pBS-CAL75 plazmidot *HpaI* és *PstI* endonukleázokkal hasítottuk, majd egy részlegesen kettősszálú oligonukleotidhoz (AK87, AK88) ligáltuk (19.ábra). A két oligonukleotid hibridizációja után létrejött duplex ligálását a 3' *PstI* vég nagy mértékben segítette. Az oligonukleotidok beépítése révén egy extra szerin aminosav is beépült a fehérjébe a His farok előtt. A beépített oligonukleotidot tartalmazó új plazmidnak a pBS-CAL76 nevet adtuk.

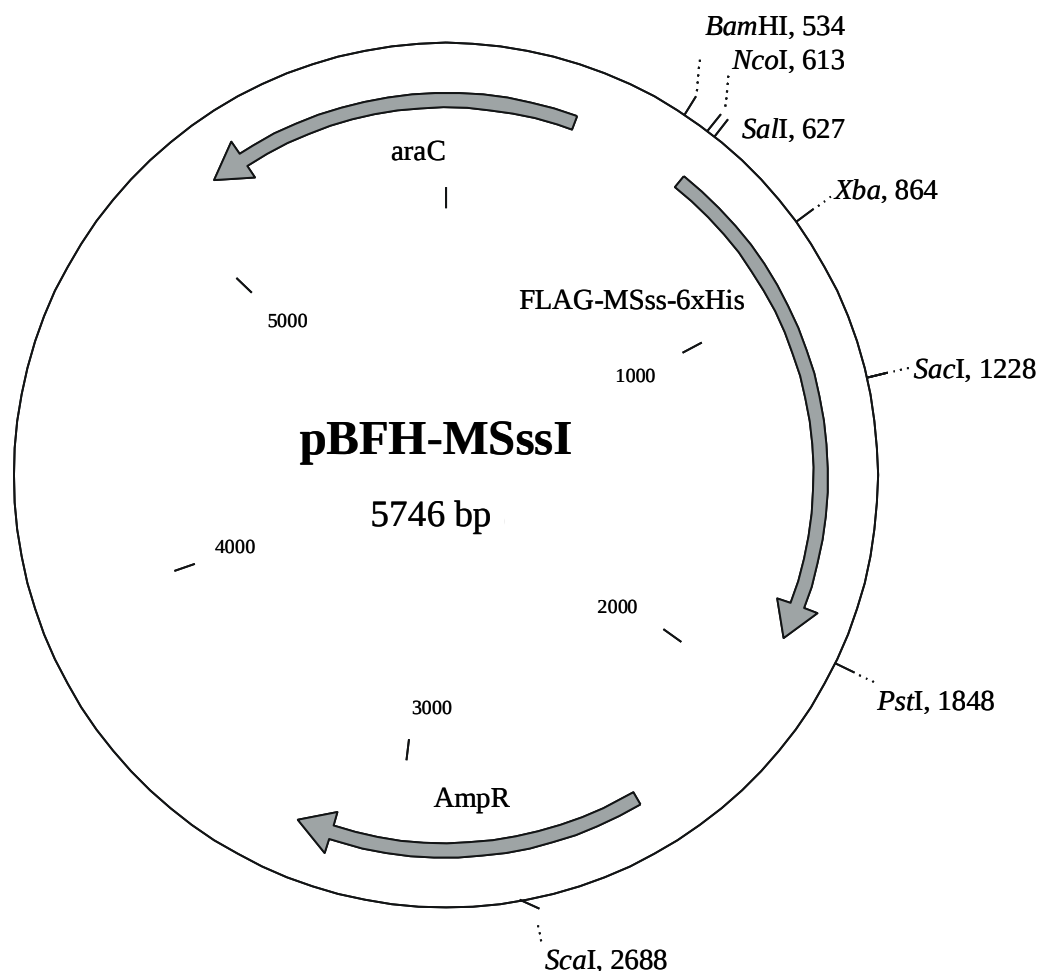
AK87 5'-CTC ATC ACC ATC ACC ATC ACT GCT AAC TGCA-3'
 AK88 3'-GAG TAG TGG TAC TGG TAG TGA CGA TTG-5'

Lys Ile Gly Gly **Ser** His His His His His His **Cys** ***
 5'-AAA ATT GGA GGT **TCT** CAT CAC CAT CAC CAT CAC **TGC** TAA CTG CA-3'

19.ábra. Az AK87 és az AK 88 oligonukleotidok szekvenciája és a pBS-CAL76 plazmidban létrejött 6XHis-Cys fúzió szerkezete. Az oligonukleotid által kódolt szerin és a végálló cisztein aminosavakat félkövér betűk jelölik.

A pBS-CAL76 plazmid *SacI-PstI* fragmentumát visszaültettük a *SacI-PstI* endonukleázokkal hasított pBFL-MSssI-2 plazmid azonos helyeire. A klónozási lépések során a represszió fenntartása végett az ER1821 sejteket 0.2% glükózt tartalmazó LB táptalajban növesztettük. Az új pBFH-MSssI nevű plazmid (20.ábra), amely a teljes *sssIM* gént tartalmazta a következő jellemzőkkel rendelkezett: N-terminális FLAG, enterokináz hasítóhely és azt követő cisztein, C-terminális 6xHis-Cys fúzió, Cys368Ala mutáció. A metilázt termelő ER1821(pBFH-MSssI) sejteket OD $\approx$ 0,5-0,6 sűrűségig növesztettük 37°C-on,

majd 0,5-1% arabinóz hozzáadása után a rázatást 30°C-on folytattuk 4 órán keresztül. A fúziós enzimet a Sigma által a FLAG-fúziós fehérjék tisztítására javasolt protokoll szerint végeztük.



20.ábra. A pBFH-MSssI plazmid szerkezete.

Ser2Cys mutáns előállítása pBFH-MSssI plazmidban

A variáns létrehozásának csak akkor van értelme, ha az *E.coli* sejtben a fehérje N-terminális formilmetioninja lehasad. Az N terminális formilmetionin lehasítását a metionil-aminopeptidáz enzim végzi. A formilmetionin

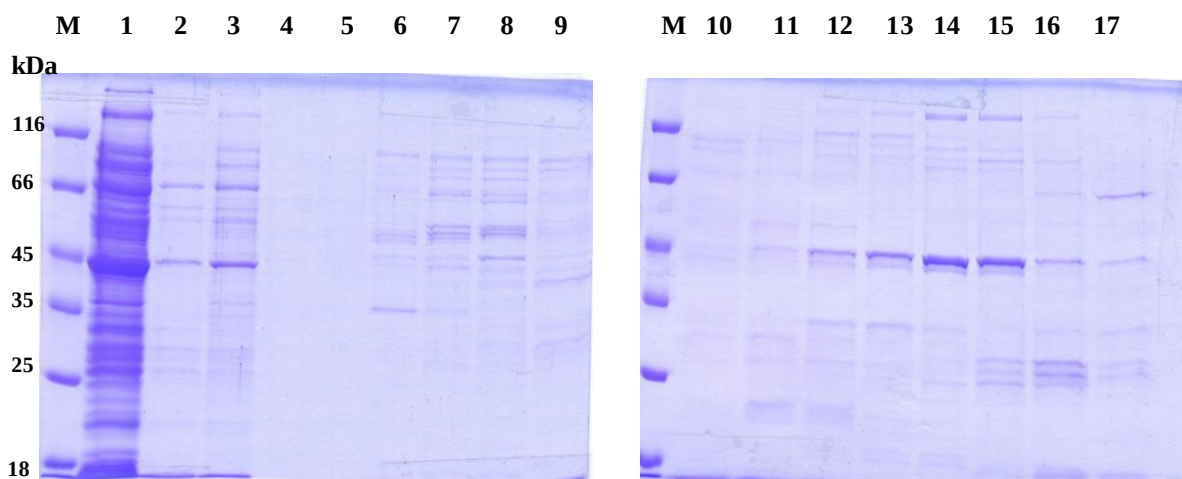
eltávolításának hatékonysága a második aminosav minőségétől függ (Hirel és mtsai., 1989).

A pCAL7 plazmidot, mint templátot felhasználva PCR reakcióban AK91 (21.ábra), és AK65 primerek segítségével amplifikáltuk az *sssIM* gén N-terminális darabját, majd a terméket T/A klónozással pTZ57R/T plazmidba ligáltuk. A kapott plazmidot pTZ-Sss7-nek neveztük.

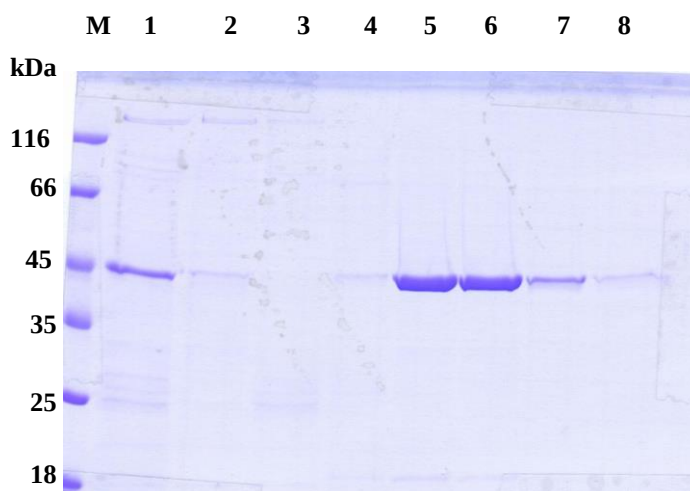
	M	C	K	V	E	N	K	T	K	
5'-GGGA	<u>TCC</u>	CAT	ATG	TGC	AAA	GTA	GAA	AAT	AAA	ACA AAA A-3'
	<i>NcoI</i>									

21.ábra. Az AK91 mutagén primer oligonukleotid szekvenciája és az általa kódolt aminosav szekvencia.

A pTZ-Sss7 251 bp-os *NcoI-XbaI* fragmentumát a pBFH-M.SssI plazmid *NcoI*, *XbaI* helyei közé építettük be. A keletkező új plazmid, a pBH-Sss7 nem volt metilált. Ennek oka feltehetőleg az lehet, hogy a pBAD24 plazmid polilinker szekvenciájának metionin kodonjával a fúziós metiltranszferáz nem volt azonos fázisban. A fázisba hozás érdekében a pBH-Sss7 plazmidot *NcoI*-el emésztettük, majd a túlnyúló 5' végeket Mung Bean nukleázzal leemésztettük. A plazmidot T4 ligázzal újra cirkularizáltattuk. Az új, pBH-MSssI-nek nevezett plazmid már működőképes fúziós metiltranszferázt kódolt, amelyet heparin-agaróz és Ni-agaróz affinitás oszlop segítségével tisztítottunk (22., 23. ábra).



22. ábra. Az M.SssI-6XHis tisztítása heparin agaróz oszlopon. M: fehérje molekulatömeg marker, 1: nyers sejt kivonat, 2: átfolyó, 3: mosó, 4-17: elúciós frakciók (0,05-1 M NaCl).



23. ábra. Az M.SssI-6XHis tisztítása Ni-agaróz oszlopon. M: fehérje molekulatömeg marker, 1: heparin-agaróz 14, 15 frakciók, 2: átfolyó, 3: mosó (5 mM imidazol), 4: mosó (30 mM imidazol), 5: elúció (500 mM imidazol) (1. frakció), 6: elúció (500 mM imidazol) (2. frakció), 7: elúció (1 M imidazol) (1. frakció), 8: elúció (1 M imidazol) (2. frakció).

Megbeszélés

Öt C5-citozin metiltranszferáz által kiváltott DNS görbítést vizsgáltunk. Kimutattuk, hogy mind az öt enzim görbületet idéz elő a specifikus felismerőkomplexben lévő DNS-ben. Az általunk használt módszer megbízhatóságának bizonyítására a *HhaI* metiltranszferázt is bevontuk a vizsgálatokba, mivel korábban ezzel az enzimmel már készültek hasonló jellegű munkák. Kísérleteink azt mutatták, hogy a *HhaI* metiltranszferáz a DNS-t 13°-os szögben görbítette. Ez az eredmény egyrészt az *M.HhaI* röntgendiffrakciós szerkezeti modellel (Klimasauskas és mtsai., 1994), másrészt a Garcia és munkatársai által közölt (Garcia és mtsai., 1996) permutációs gélretardáció eredményeinek is ellentmondott. Mivel Garcia és munkatársai csak két felismerőkomplex relatív mobilitásából számolták ki a DNS görbítési szöget (2°), úgy gondoljuk, hogy a mi hat komplexet figyelembe vevő meghatározásunk pontosabb. Ezt alátámasztani látszik az a tény is, hogy ugyanebben a munkában egy elektronmikroszkópos módszerrel való meghatározás eredményeit is közölték, és ezek a mérések 10-15°-os görbítést mutattak.

A *HaeIII* metiltranszferázzal végzett vizsgálataink egyértelműen bizonyították, hogy a felismerőkomplexben a DNS meghajlik. Ez az eredmény ellentmond a *HaeIII* metiltranszferáz felismerőkomplex kristályszerkezeti modelljének, amelyben a DNS egyenes. Mivel sem a permutációs gélretardációnál, sem a phasing analízisnél nem észleltünk elektroforetikus anomáliákra utaló jeleket, nagy biztonsággal állíthatjuk, hogy az általunk kapott eredmények nem kísérleti műtermékek. Gélelektroforetikus anomáliák, amelyek megtévesztően DNS görbítésre utaló jeleket mutattak, egyes leucin-zipper családba tartozó fehérjék, illetve merev fehérje motívumok vizsgálatakor merültek fel (McCormick és mtsai., 1996). A DNS alakjában mutatkozó különbség magyarázata az lehet, hogy a kristályszerkezet és a gélretardációs

teszt két egymástól eltérő fehérje-DNS komplexet jellemez. A röntgendiffrakciós modell a reakcióút egy későbbi lépcsőjéről, a metilcsoport átvitele utáni állapotról készült. Az is lehetséges, hogy a röntgendiffrakciós szerkezetben látott egyenes DNS valójában csak műtermék, amit a kristályosítás során használt magas sókentráció, vagy a kristályosítás során fellépő feszülési erők (crystal packing forces) idéznek elő.

Milyen szerepet tölt be DNS görbítés a metilációs folyamat során? Egy lehetséges válasz erre a kérdésre az, hogy a DNS görbítése a szekvenciaspecifikus DNS felismerés mellett elősegíti a báziskifordulást (*base flipping*). A két kristályszerkezeti modellben jól látszik a metilált citozin 180°-os kifordulása a kettősspirálból. Molekuláris modellezési vizsgálatok egy kapcsolatot tártak fel a báziskifordulás és a DNS görbítés között. E szerint, a DNS meggörbülése elősegíti a báziskifordulást, ugyanakkor a báziskifordulás után a DNS könnyebben hajlik meg (Ramstein és mtsai., 1988). Ez a gondolat felveti azt az érdekes kérdést, hogy a DNS görbítés a vizsgált C5-citozin metiltranszferázok esetében a báziskifordulásnak oka vagy következménye. Két modell lehetséges. Az egyik szerint a DNS görbítés a primer folyamat, amely aztán elősegíti a metilálandó citozin kifordulását a kettősspirálból. A másik lehetőség, hogy a görbítés a citozin kifordulása után következik be és a görbítés funkciója így a kialakult szerkezet stabilitásának fenntartása. A második modell valószínűbb. Bizonyíték lehet erre egyrészt az egymás fölötti bázisok kapcsolatából számított, B-DNS-re vonatkoztatott energia értékek (stacking energy). A teljes stacking energiaértékek (mind az ugyanazon a szálon lévő, mind a komplementer szálon lévő bázisok között fellépő kölcsönhatásokkal számolva) a citozin bázisra vonatkoztatva N $\overline{\text{C}}$ C környezetben a következők lehetnek: ha N=Adenin: -6,82; N=Citozin: -5,52; N=Guanin: -7,81; N=Timin: -5,75 kcal/mol. Ez a C $\overline{\text{C}}$ G környezetben (M.*Hpa*II-re esete) -6,17 kcal/mol. Mivel ezek az értékek nem térnek el nagy mértékben egymástól, így nem magyarázzák miért látunk drasztikus különbséget az *Msp*I (140°) és a *Hpa*II

(30°) metiltranszferázok által kiváltott DNS görbítés között. Az energiaértékek hasonló DNS hajlítási mértéket feltételeznének. A második modellt, tehát a báziskifordulás elsődlegességét támasztja alá az is, hogy a phasing analízis szerint a *HaeIII* és a *BspRI* metiltranszferáz is a kisárok irányába hajlítja a DNS-t. Molekulamodellezési számítások szerint a báziskifordulás a kisárok felé energetikailag sokkal kedvezőtlenebb, mint a nagyárok felé, mivel a kisárki funkciós csoportok torlódásához vezet (Ramstein és Lavery, 1988). Ha a DNS a felismerőkomplexben a kisárok felé hajlik, mint azt a kísérleteink mutatják, akkor a hajlítás várhatóan inkább akadályozná, mint segítené a báziskifordulást. A DNS görbítés valószínűleg a báziskifordulás után jöhet létre, funkciója pedig a DNS hélix stabilitásának fenntartása a felismerőkomplexben. Az *EcoRI* adenin metiltranszferáz esetében hasonló sorrendet állapítottak meg a DNS görbítés és a báziskifordulás között (Allan és mtsai., 1996). A legújabb, *HhaI* metiltranszferázzal végzett molekulaenergetikai számítások arra a következtetésre vezettek, hogy a báziskifordulás a DNS nagyárában történik (Huang és mtsai., 2003). Ez némileg új megvilágításba helyezi a korábbi görbítés és báziskifordulás kapcsolatáról alkotott elképzelésünket. Ha a citozin a nagyárok felé fordul ki a kettős spirálból, nincs akadálya annak, hogy a DNS hajlítás megelőzze a báziskifordulást. A báziskifordulás és a DNS görbítés sorrendjének a tisztázása tehát még további kísérletes munkát igényel.

A *HaeIII* és a *BspRI* metiltranszferázok a metilált felismerőhelyet tartalmazó fragmentumokat, habár kisebb mértékben, de képesek voltak meggörbíteni. Ez a megfigyelés nem mond ellent az általunk javasolt görbítés és báziskifordulási sorrendnek. A *HhaI* metiltranszferáz metilált DNS-sel alkotott felismerőkomplexének kristályszerkezeti modelljében a metilált citozin hasonló módon fordul ki a DNS kettősspirálból, mint a metilálatlan citozin (O'Gara és mtsai., 1996, Roberts és Cheng, 1998).

Az 2. táblázatban a C5-citozin metiltranszferázok szekvenciaspecifikus DNS felismerésére vonatkozó egyes kísérleti eredményeket foglaltuk össze. Az

adatokat aszerint csoportosítottuk, hogy a metilázok milyen felismerőszekvenciával rendelkeznek, indukálnak-e DNS görbítést, illetve milyen a hidroxilgyökös footprint pozíciója a felismerőhely centrumához képest. Annak ellenére, hogy a táblázat a *HhaI* metiláz kivételével nem rendelkezik minden enzimet kimerítően jellemző adatokkal, egy hipotézis állítható fel a felismerőszekvencia és az enzim DNS-sel kialakított kapcsolata között. Azok az enzimek, amelyek felismerőszekvenciájában a metilálandó citozint guanin követ, kisebb DNS görbületet hoznak létre, mint amelyek felismerőszekvenciájában ebben a pozícióban citozin van. A hidroxil gyökös footprint eredmények az egyes enzimek felismerőkomplexének elhelyezkedését mutatják a felismerőszekvencia pozíciójához képest. Három C5-citozin metiltranszferázról van footprint adatunk (2.táblázat). Mindhárom metiláz hidroxilgyökös footprintje aszimmetrikus elhelyezkedést mutat a felismerőszekvencia középpontjához képest. Az eltolódási irány az általunk javasolt két csoportnak megfelelően különbözik. Az *SssI* és a *HhaI* metiltranszferázok footprintje 5' irányban, a *BspRI* metiláz footprintje pedig 3' irányban van eltolódva a felismerőszekvencia középpontjához viszonyítva.

Annak ellenére, hogy a C5-citozin metiltranszferázok szerkezetében jelentős hasonlóság van (Kumar és mtsai., 1994), az *in vitro* kísérletek eredményei, illetve a rendelkezésre álló kristályszerkezeti modellek azt sugallják, hogy ezeknek az enzimeknek a DNS szubsztrátfelismerésében igen nagy különbségek vannak. Ezt támasztják alá a *HhaI* és *HaeIII* metiláz röntgendiffrakciós szerkezetében (Klimasauskas és mtsai., 1994; Reinisch és mtsai., 1995), valamint a *HhaI*, *SssI* és *BspRI* metiltranszferáz footprint fenotípusában észlelhető különbségek (Renbaum és Razin, 1995; Finta és Kiss, 1997) is.

Remélhetőleg a jövőben más C5-citozin metiltranszferázok kristályszerkezeti modelljeit is megismerjük, amelyek majd igazolhatják, vagy megcáfolhatják a hipotézisünket.

Az M.SssI variánsok

A SssI metiltranszferáz variánsok létrehozásával elvben lehetőség nyílik olyan „programozható” enzimek előállítására, amelyek oligodezoxinukleotidokhoz (ODN), illetve peptid nukleinsavakhoz (PNA) köthetők és DNS-hez való kötődésük, ezáltal szekvenciaspecifitásuk nagy mértékben a kovalensen kötött ODN/PNA szekvenciájának függvénye lesz. A variánsok tervezésénél szem előtt kellett tartanunk azt a feltételt, hogy a fehérjéket minél egyszerűbb módszerekkel, homogenitásig tudjuk majd tisztítani. Ennek érdekében olyan konstrukciókat próbáltunk létrehozni, amelyek valamilyen fúziós fehérjepartnerhez kötöttek.

Az SssI metiltranszferáz génjének módosítása során arra törekedtünk, hogy a metiltranszferáz alkalmas legyen majd az ODN/PNA molekulákhoz való kapcsolásra. Kezdetben a metiltranszferáz variánsokat a pCAL7 plazmid módosításával próbáltuk elkészíteni. Ezekkel a klónokkal nem sikerült ezeket a fehérjéket a kívánt mértékben túltermeltetni és homogenitásig tisztítani. Az ezekkel a konstrukciókkal végzett munka kudarca arra kényszerített minket, hogy a könnyű tisztíthatóság érdekében fúziós metiltranszferázokat hozzunk létre. A kémiai peptid ligációhoz szükséges, N-terminális ciszteint hordozó variánst a pBAD24 plazmid alapú FLAG fúziós klónokkal hoztuk létre. A FLAG-M.SssI illetve a FLAG-M.SssI-74 metiltranszferázokat homogenitásig tudtuk tisztítani a FLAG-affinitásoszlopon. Annak érdekében, hogy az N-terminális ciszteinnel rendelkező metiltranszferázt kapjunk, a FLAG-M.SssI variánsokat enterokinázzal hasítottuk.

Az N-terminális ciszteint hordozó M.SssI előállítását más úton is megkíséreltük. Olyan pBAD24 alapú konstrukciót hoztunk létre, amelyben a kezdő metionint egy cisztein követ. Ez a terv arra a nagyon valószínű feltételezésre épült, hogy a sejtben a kezdő formilmetionin aminosav lehasad a fehérjéről, ezzel létrehozva a kívánt N-terminális ciszteint. Ezen variáns

affinitásoszlóppal történő tisztíthatóságát úgy érték el, hogy egy C-terminálisan elhelyezkedő 6xHis fúziós peptidet kódoló oligonukleotidot építettünk az *sssIM* génhez.

Az, hogy csak a pBAD24-alapú plazmidok adtak stabil klónt, azzal magyarázható, hogy a fehérje termelést irányító arabinóz promóter nagy mértékben kontrollálható. Csak akkor kaptunk jelentős metiltranszferáz túltermelődést, ha a tápfolyadékba arabinózt tettünk. A metiltranszferáz variánsok túltermelésekor az indukciós szakaszban a sejteket 30°C-on tartottuk, ezzel kívántuk növelni a tisztítani kívánt fehérjék oldhatóságát.

Számos más konstrukciót is létrehoztunk, amelyek, mint utóbb kiderült, sajnos nem voltak sikeresek a munka követelményei szempontjából. A pET3His vektor alapú, N-terminálisan 6xHis peptidet hordozó variánsok (pETHis-MSssI, pETHis-MSssI-74) aktívak voltak ER1821 törzsben, de nem voltak jól túltermelhetők. Ez azzal volt magyarázható, hogy a pET3 plazmid indukciója speciális gazdát, a kromoszomán a T7 polimeráz génjét hordozó *E.coli* BL21 törzset igényli. Sajnos a BL21 baktériumtörzs nem *mcrBC*⁻, *mcrA*⁻, *mrr*⁻ törzs, ezért a pET3His plazmid alapú konstrukciókat, amelyek aktív C5-citozin metiltranszferázokat hordoznak, ezekbe a sejtekbe nem lehet bejuttatni. Ezért a pET3His-MSssI és pET3His-MSss-74 plazmidokat ER1821 törzsben tartottuk fenn, majd a metiltranszferáz termeléshez a T7 RNS polimeráz génjét a λCE6 fágfertőzéssel juttattuk be. Az elérhető maximális fág-titer mellett is csak nagyon kis mennyiségben szintetizálódott az enzim. További próbálkozásként létrehoztunk egy ER1821(DE3) lizogén törzset is, de sajnálatos módon ezekbe a sejtekbe különböző, T7 RNS polimeráz aktivitást csökkentő plazmidok (pVH1(lacIq), pLysE vagy pLysS (Moffat és Studier. 1987) mellett sem sikerült a pETHis-MSssI, pETHis-MSssI-74 plazmidokat bejuttatni.

A munka során végig problémát jelentett az M.SssI metiltranszferáz toxicitása. Számos esetben tapasztaltuk, hogy a sejtek fehérjetermelés indukciója után elpusztultak. Feltételeztük, hogy a toxicitásért a DNS kiterjedt metilációja

felelős. Létrehoztuk az M.SssI inaktív változatát, amely metilációra képtelen, de a szekvenciaspecifikus DNS kötése megmarad. Hasonló, az *EcoRII* metiltranszferázzal végzett kísérletekből tudjuk, hogy az inaktív metiltranszferázok metilációs képességük elvesztése után is képesek szekvenciaspecifikus DNS kötésre (Gabbara és mtsai., 1995). Meglepetésünkre az inaktív enzim is toxikus volt a sejt számára. A fehérjegyéleken az egyébként csekély mértékben túltermelt inaktív M.SssI mellett levő többi fehérje termelődése visszaszorulni látszott. Ezek után úgy véljük, hogy a toxicitásért valószínűleg a metiláz DNS-hez való kötődése a felelős. A sejt saját DNS-e is számos CG felismerőszekvenciát tartalmaz, amelyek mind potenciális célpontok a metiltranszferáz számára. A toxicitás így azzal magyarázható, hogy a megnövekedett enzimmennyiség hatására a metilálható CG helyek telítődnek aktív enzimekkel, amelyek így fizikai gátat szabnak a sejt számára létfontosságú gének átíródásának, vagy a replikációnak.

A pBAD24 plazmid alapú konstrukciók sikerének az oka az lehet, hogy ezeknél a plazmidoknál az *araBAD* operon átíródását igen szigorú módon lehet szabályozni azáltal, hogy teszünk-e a tápfolyadékba arabinózt vagy sem. Mivel az *araBAD* operon katabolit represszióra érzékeny, az enzimszintet tovább lehet csökkenteni glükóz hozzáadásával.

A hatékony tisztítás érdekében előállítottunk egy ún. „kombinált” variánst is. A pBFH-MSssI nevű plazmid olyan metiltranszferázt hordoz, amely egyrészt N-terminális FLAG, C-terminális 6xHis-Cys fúziós peptideket kódol, másrészt a Cys368Ala mutációt is hordozza. Ennek a variánsnak abban rejlik az előnye, hogy a ODN-hez vagy PNA-hoz való kötés után is affinitásoszloppal lehet tisztítani a már konjugált metiltranszferázt.

Irodalmi hivatkozások

Allan, B.W., Garcia, R., Maegley, K., Mort, J., Wong, D., Lindstrom, W., Beechem J.M. és Reich, N.O. 1999. DNA bending by *EcoRI* DNA methyltransferase accelerates base flipping but compromises specificity. *J Biol. Chem.* 274: 19269-19275.

Allan, B.W. és Reich, N.O. 1996. Targeted base stacking disruption by the *EcoRI* DNA methyltransferase. *Biochemistry*. 35: 14757-14762.

Arber, W. 1965. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli* V. The role of methionine in the production of host specificity. *J. Mol. Biol.* 11: 247-256.

Biggin, M.D., Gibson, T.J. and Hong, G.F. 1983. Buffer gradient gels and ³⁵S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3963-3965.

Cal, S. and Connolly, B.A. 1995. The *EcoRV* modification methylase causes considerable bending of DNA upon binding to its recognition sequence GATATC. *J. Biol. Chem.* 271: 1008-1015.

Card, C.O., Wilson., G.G., Weule, K., Hasapes, K., Kiss, A. és Roberts, R.J. 1990. Cloning and characterization of the *HpaII* methylase gene. *Nucl. Acids Res.* 18: 1377-1383.

Chen, B. És Hai, T.1994. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene*, 139: 73-75.

Chen, R.Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L. és Jaenisch, R. 1998. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395, 89-93.

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., Pósfai, J., Pflugrath, J.W. and Roberts, R.J. 1993. Crystal structure of the *HhaI* DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* 74: 299-307.

Dawson, P., Muir, T., Clark-Lewis, I. és Kent, S. 1994. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science*. 266: 776-779.

Dubey, A.K. and Bhattacharya, S.K. 1997. Angle and locus of the bend induced by the *MspI* DNA methyltransferase in a sequence-specific complex with DNA. *Nucl. Acids Res.* 25: 2025-2029.

Efstratiadis, A. 1994. Parental imprinting of autosomal mammalian genes. *Curr. Opin. Genetic. Dev.* 4: 265-280.

Fasman, G.D. 1975. CRC Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. 3rd edn., vol.1. *CRC Press*, Cleveland, Ohio.

Ferrari, S., Harley, V.R., Pontiggia, A., Goodfellow, P.N., Lowell-Badge, R. and Bianchi, M.E. 1992. SRY, like HMG1, recognize sharp angles in DNA. *EMBO J.* 11: 4497- 4506.

Finta, C. and Kiss, A. 1997. Footprint analysis of the *BspRI* DNA methyltransferase-DNA interaction. *Nucl. Acids Res.* 25: 2841-2846.

Gabbara, S., Sheluho D., Bhagwat, A.S. 1995. Cytosine methyltransferase from *Escherichia coli* in which active site cysteine is replaced with serine is partially active. *Biochemistry*, 34(27):8914-8923.

García, R.A., Bustamante, C.J. and Reich, N.O. 1996. Sequence-specific recognition by cytosine C⁵ and adenine N⁶ DNA methyltransferases requires different deformations of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7618-7622.

Gartler, S.M. and Riggs, A.D. 1983. Mammalian X chromosome inactivation. *Ann. Rev. Genet.* 17: 155-190.

Gong, W., O’Gara, M., Blumenthal, R.M. and Cheng, X. 1997. Structure of *PvuII* DNA-(cytosine N4) methyltransferase, an example of domain permutation and protein fold assignment. *Nucl. Acids Res.* 25: 2702-2715.

Heitman, J. és Model, P. 1987. Site-specific methylases induce the SOS DNA repair response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 169: 3243-3250.

Hengen, P.N. 1995. Electro-transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *Computer corner. TIBS* 20: 248-249.

Hirel, H., Schmitter, J-M., Dessen, P., Fayat, G. és Blanquet, S. 1989. Extent of N-terminal methionin excision from *Escherichia coli* proteins is governed by side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8247-8251.

Huang, N., Banavali, N.K. és MacKerell, A.D.Jr. 2003. Protein-facilitated base flipping in DNA by cytosine-5-methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 68-73.

Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson C., Lander E., és Jaenisch, R.

2001. Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.*, 27, 31-39.

Jeltsch, A., Christ, F., Fatemi, M. és Roth, M. 1999. On the substrate specificity of DNA methyltransferases. Adenine-N6 DNA methyltransferases also modify cytosine residue at position N4. *J. Biol. Chem.* 274: 19538-19544.

Jeltsch, A. 2001. The cytosine N4-methyltransferase M.PvuII also modifies adenine residues. *Biol. Chem.* 382: 707-710.

Kagan, R.M. and Clarke, S. 1994. Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 310: 417-427.

Karreman, C. és de Waard, A. 1988. Isolation and characterization of the modification methylase M.SinI. *J. Bacteriol.* 170: 2533-2536.

Kim, J., Wu, C., Zwieg, C., Wu, C. and Adhya, S. 1989. Bending of DNA by gene-regulatory proteins: construction and use of a DNA bending vector. *Gene* 85: 15-23.

Kiss, A., Pósfai, Gy., Zsurka, G., Raskó, T. és 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., Timinskas, A., Menkevicius, S., Butkiene, D., Butkus, V. and Janulaitis, A. 1989. Sequence motifs characteristic of DNA (cytosine-N4) methyltransferases: similarity to adenine and cytosine C5-methylases. *Nucl. Acids Res.* 17: 9823-9832.

Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J. and Cheg, X. *HhaI* methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. 1994. *Cell* 76: 357-369.

Koncz, C., Kiss, A. and Venetianer, P. 1978. Biochemical characterization of the restriction-modification system of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Biochem.* 89: 523-529.

Kosaganov, Y., Stetsenko, D., Lubyako, E., Kvito, N., Lazurkin, Y. és Nielsen, P. 2000. Effect of temperature and ionic strength on the dissociation kinetics and lifetime of PNA-DNA triplex. *Biochemistry.* 39. 11742-11747.

Kovács, A. 1991. A *BspRI* modifikációs metiláz DNS-kötő sajátágának vizsgálata. Diplomamunka JATE, Szeged.

- Kulasauskas, S., Lubys, A. and Ehrlich, D.** 1995. DNA restriction-modification systems mediate plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 177: 3451-3454.
- Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Pósfai, J., Roberts, R.J. and Wilson, G.G.** 1994. The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* 22: 1-10.
- Kunkel, T.A., Roberts, J.D. és Zakour, R.A.** 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods in Enzymology.* 154: 367-383.
- 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.*TaqI* in complex with the cofactor S-adenosylmethionine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10957-10961.
- Lane, D., Prentki, P. and Chandler, M.** 1992. Use of gel retardation to analyse protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 509-528.
- Lauster, R.** 1989. Evolution of the type II DNA methyltransferases. A gene duplication model. *J. Mol. Biol.* 206: 313-321.
- Lederberg, E.M. és Cohen, S.N.** 1974. Transformation of *Salmonella thyphimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J.Bacteriol.* 119: 1072-1074.
- Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R.** 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926.
- Li, E., Beard, C. and Jaenisch, R.** 1993. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366: 362-365.
- Matsou, K., Silke, J., Gramatikoff, K. és Schaffner, W.** 1994. The CpG-specific methylase SssI has topoisomerase activity in presence of Mg^{2+} . *Nucl. Acids Res.* 22: 5354-5359.
- McCormick, R.J., Badalian, T. és Fisher, D.E.** 1996. The leucine zipper may induce electrophoretic mobility anomalies without DNA bending. *Proc.Natl. Acad. Sci.USA* 93, 14434-14439.
- McNamara, A.R., Hurd, P.J., Smith, A.E.F. és Ford, K.G.** 2002. Characterisation of site-biased DNA methyltransferases: specificity, affinity an subsite relationships. *Nucl. Acids Res.* 30: 3818-3830.
- Messer, W. and Noyer-Weider, M.** 1988. Timing and targeting:The biological function of Dam methylation in *E .coli*. *Cell* 54: 735-737.

Mi, S. és Roberts, R.J. 1993. The DNA binding affinity of *HhaI* methylase is increased by a single amino acid substitution in the catalytic center. *Nucl. Acids Res.* 21: 2459-2464.

Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H. és Kakutani, T. 2001. Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature*, 411, 212-214.

Moffat, B.A. és Studier, F.W. 1987. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*. 49(2): 221-227.

Nagaich, A.K., Appella, E. and Harrington, R.E. 1997. DNA bending is essential for the site-specific recognition of DNA response elements by the DNA binding domain of the tumor suppressor protein p53. *J. Biol. Chem.* 272: 14842-14849.

Naito, T., Kusano, K. and Kobayashi, I. 1995. Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267: 897-899.

Nielsen, P. 2001. Peptid nucleic acid targetting of double-stranded DNA. *Methods in Enzymology*. 340: 329-341.

Norranders, J., Kempe, T. and Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 26: 101-106.

Oberlé, I., Rousseau, F., Heitz, D., Kretz, C., Devys, D., Hanauer, A., Boué, J., Bertheas, M.F. and Mandel, J.L. 1991. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 252: 1097-1102.

O' Gara, M., Klimasauskas, S., Roberts, R.J. és Cheng, X. 1996. Enzymatic C5-cytosine methylation of DNA: Mechanistic implications of new crystal structures for *HhaI* methyltransferase-DNA-AdoHcy complexes. *J. Mol. Biol.* 261: 634-645.

Otwinowski, Z., Schevitz, R.W., Zhang, R.G., Lawson, C.L., Joachimiak, A., Marmorstein, R.Q., Luisi, B.F. and Sigler, P.B. 1988. Crystal structure of *trp* repressor / operator complex at atomic resolution. *Nature* 335: 321-329.

Pósfai, Gy., Kiss, A. Erdei, S., Pósfai, J. and Venetianer, P. 1983. Structure of the *Bacillus sphaericus* R modification methylase gene. *J. Mol. Biol.* 170: 597-610.

Pósfai, Gy., Kiss, A., and Venetianer, P. 1986. Overproduction of the *Bacillus sphaericus* R modification methylase in *Escherichia coli* and its purification to homogeneity. *Gene* 50: 63-67.

Pósfai, J., Bhagwat, A.S., Pósfai, Gy. and Roberts, R.J. 1989. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* 17: 2421-2435.

Quint, A. és Cedar, H. 1981. *In vitro* methylation of DNA with *HpaII* methylase. *Nucl. Acids Res.* 9: 633-646.

Raleigh, E.A. and Wilson, G. 1986. *Escherichia coli* K12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 9070-9074.

Ramstein, J. és Lavery, R. 1988. Energetic coupling between DNA bending and base pair opening. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 85, 7231-7235

Raleigh, E.A. és Wilson, G. 1986. *Escherichia coli* K-12 restricts DNA containing 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 9070-9074.

Ray, A. és Nordén, B. 2000. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *The FASEB Journal* 14: 1041-1058.

Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L. and Lipscomb, W.N. 1995. The crystall structure of *HaeIII* methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* 82: 143-153.

Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G., Rottem, S. és Razin, A. 1990. Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the CpG DNA methylase from *Spiroplasma sp.* strain MQ1(M.SssI). *Nucleic Acids Res.*18: 1145-1152.

Renbaum, P. and Razin, A. 1992. Mode of action of the *Spiroplasma* CpG methylase M.SssI. *FEBS Letters.* 313: 243-247.

Renbaum, P. and Razin, A. 1995. Footprint analysis of M.SssI and M.*HhaI* methyltransferases reveals extensive interactions with the substrate DNA backbone. *J. Mol. Biol.* 248: 19-26.

Rideout III, W.M., Coetzee, G.A., Olumi, A.F. and Jones, P.A. 1990. 5-methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249:1288-1290.

Roberts, R.J., Vincze, T., Pósfai, J. és Macelis, D. 2003. REBASE: restriction enzymes and methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 31: 418-420.

Roberts, R.J. és Cheng, X. 1998. Base flipping. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 181-198.

Russel, M., Kidd, S. és Kelley, M.R. 1986. An improved filamentous helper phage for generating single-stranded plasmid DNA. *Gene*. 45: 333-338.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Smit, A.F. 1999. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9: 657-663

Studier, F.W., Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189: 113-130.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. és Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*. 185: 60-89.

Szilák, L., Venetianer, P. és Kiss, A. 1990. Cloning and nucleotide sequence of the genes coding for the *Sau96I* restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res.* 18: 4659-4664.

Szilák, L., Finta, Cs., Patthy, A., Venetianer, P. and Kiss, A. 1994. Self-methylation of *BspRI* DNA-methyltransferase. *Nucl. Acids Res.* 22: 2876-2881.

Szomolányi, É., Kiss, A. and Venetianer, P. 1980. Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli*. *Gene* 10: 219-225.

Thompson, J.F. and Landy, A. 1988. Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to α site-specific recombination complexes. *Nucl. Acids Res.* 20: 9687-9705.

Xu, G-L. és Bestor, T.H. 1997. Cytosine methylation targeted to pre-determined sequences. *Nat. Genet.* 17: 376-378.

Yoder, J.A., Walsh, C.P. és Bestor, T.H. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, 13: 335-340.

Walsh, C.P., Chaillet, J.R. és Bestor, T.H. 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.*, 20: 116-117.

Wilson, G.G. and Murray, N.E. 1991. Restriction and modification systems. *Ann. Rev. Genet.* 25: 585-627.

Wu, J.C. and Santi, D.V. 1987. Kinetic and catalytic mechanism of *HhaI* methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 262: 4778- 4886.

Wyszynski, M.W., Gabbara, S.és Bhagwat, A.S. 1992. Substitutions of a cysteine conserved among DNA cytosine methylases result in a variety of phenotypes. *Nucl. Acids Res.* 20: 319-326.

Summary

DNA bending induced by DNA (cytosine-5) methyltransferases

Footprinting studies with the *M.BspRI* C5-cytosine methyltransferase suggested that the enzyme might induce a distortion, perhaps a bend in substrate DNA. We performed mobility shift assays using a circularly permuted set of DNA fragments. This method relates electrophoretic mobility of DNA-protein complexes to the position of the complex within the fragment. For preparation of the circularly permuted set of fragments, a plasmid (pBend-GGCC) was constructed and a ^{32}P -labeled DNA fragment was synthesized in vitro by PCR amplification of the polylinker segment of pBend-GGCC. A permuted set of fragments was generated by cleaving the PCR product with restriction enzymes having cleavage sites in the tandem repeats. Complexes were formed between the radioactively labeled fragments and purified *M.BspRI*, and they were analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gels. The autoradiogram of the gel showed that mobility of the complexes depended on the position of the methyltransferase binding site. Complexes of fragments with the binding site near to one of the ends migrated faster than complexes with the binding site near to the middle of the fragments. Such electrophoretic behavior characterizes complexes in which the DNA is bent. Calculations yielded bend values between 46° and 50° . This was a surprising observation in the light of the X-ray structure of the *M.HaeIII*-DNA complex, because in the crystal the DNA was unbent. *M.BspRI* and *M.HaeIII* have the same specificity, share extensive sequence homology and presumably recognize substrate DNA in a similar fashion. We performed similar gel shift experiments with *M.HaeIII*, and found that this enzyme also induced a 40° - 43° bend. To obtain additional evidence for protein-induced DNA curving, we performed phasing experiments with the *BspRI* and *HaeIII* methyltransferases. This method relates complex mobility to the helical

phasing between the protein-induced bend and a sequence-directed intrinsic bend on the same DNA fragment. In these experiments we used a set of DNA fragments which carried three helically phased (A/T)₅-tracts and a single GGCC site. The fragments differed from each other in the distance between the GGCC site and the (A/T)₅-tracts. It is known that (A/T)₅-tracts are characterized by a bend toward the minor groove, thus the direction of a protein-induced bend can be derived from the dependence of electrophoretic mobility on the helical phasing between the two bends. In designing this experiment, we wanted to avoid potential problems arising from the fact that an unmethylated GGCC site can bind methyltransferase molecules in either of two orientations, and the two resulting complexes may not be equivalent with regard to the position of the induced bend. Therefore, to allow just one binding orientation, hemimethylated DNA fragments were prepared. Autoradiography of the gels with complexes formed between *M.HaeIII* and the labeled fragments showed that the relative mobility was a function of the distance between the (A/T)₅-tracts and the GGCC site. The complex migrating with the lowest relative mobility was formed with the fragment, in which the distance between the center of the intrinsic bend and the GGCC site was 73 bp, which corresponds to approximately seven helical turns of B DNA. The complex with the fragment in which this distance was 69 bp (close to 6.5 helical turns) migrated with the highest relative mobility. The pattern of the relation between mobility and the distance of the bend centers suggests that the direction of the protein-induced bend is toward the minor groove. Similar results were obtained with *M.BspRI*.

A possible explanation of the contradiction between our data (*M.HaeIII*-induced bend) and the crystal structure (unbent DNA in the *M.HaeIII* complex) could be that the gel shift experiments characterize the initial recognition complex, whereas the X-ray structure was that of a post-methyl transfer intermediate, in which the enzyme and the DNA substrate were covalently bound. We considered a model in which, at the beginning of the methylation

reaction, the enzyme induces a curvature in the DNA to facilitate sequence-specific recognition and base flipping, then after the methyl transfer has occurred, the DNA again assumes the undistorted B form. To test this hypothesis, circular permutation gel shift assays were performed with PCR-generated fragments that had been methylated *in vitro*. These experiments yielded a protein-induced bend of 32 - 33°.

Because of the contradiction between the *M.HaeIII* structure and our results, we were concerned that the observed electrophoretic behavior of the *M.HaeIII* and *M.BspRI* complexes might be due to some DNA conformational effect other than bending. Former studies with the *M.HhaI*-DNA complex by circular permutation gel shift assay and scanning force microscopy showed no protein-induced bending. Thus, *M.HhaI* methyltransferase seemed a good candidate as a control enzyme. We constructed the plasmid pBend-GCGC and used it to synthesize permuted fragments with a single *HhaI* recognition site. Gel shift assay with *M.HhaI* showed only a very slight bend. This finding increases the reliability of our data with *M.HaeIII* and *M.BspRI*.

We extended the studies to three other C5-cytosine methyltransferases: *M.SinI* (GGWCC), *M.Sau96I* (GGNCC), and *M.HpaII* (CCGG). We had chosen *M.SinI* and *M.Sau96I* because the recognition sites of these enzymes are related to the recognition site of *M.BspRI/M.HaeIII* and represent different degrees of degeneracy. *M.HpaII* was chosen because it shares recognition specificity with *M.MspI* (CCGG), an enzyme which had previously been shown to cause a very sharp DNA bend (130-140°). Data from experiments with *M.BspRI*, *M.HaeIII* and *M.HhaI* suggested a connection between the magnitude of the methyltransferase-induced DNA bend and the base recognized 3' to the target cytosine. We thought that it would be interesting to test *M.HpaII* which differs from *M.MspI* in the methylated base. To generate permuted sets of fragments with single binding sites for *M.SinI* and *M.HpaII*, the plasmids pBend-GGWCC and pBend-CCGG were constructed. *M.Sau96I* has two

recognition sites: GG^A/TCC and GG^G/CCC. Interaction with the GG^A/TCC site was tested with fragments obtained from pBend-GGWCC. For the GG^G/CCC site, fragments amplified from the pBend-GGCC template were used because the GGCC site in the plasmid overlaps with a GGSCC sequence.

All three enzymes produced mobility shift patterns which are characteristic for protein-induced bending. The bend angles were estimated to be 30°, 34° - 37° and 52° - 57° for *M.HpaII*, *M.SinI* and *M.Sau96I*, respectively. The *Sau96I* methyltransferase bent fragments containing either recognition site to a similar degree. Perhaps the most interesting observation in these experiments was that *M.HpaII* induced only a moderate curve in substrate DNA. This differs drastically from the bend characterizing the *M.MspI* complex.

What function DNA bending could have in the action of a DNA methyltransferase? In addition to possible role in sequence-specific DNA recognition, it may play a role in base flipping. During base flipping the target base is rotated out from the helix by 180°. A connection between bending and base pair opening was indicated by molecular modeling. It was shown that DNA bending facilitates base pair opening and that, conversely, once a base pair is disrupted, DNA can bend very easily. This leads to the question whether bending is a cause or a consequence of base flipping. One of the alternatives is that DNA bending is a mechanism by which the enzyme overcomes the forces holding the target base in the helix. Alternatively, bending may follow base flipping in time and its role may be to stabilize the DNA structure after the base has flipped out. We believe that the second model seems to be more likely. The newest molecular modeling based on free-energy calculation indicates that base rotation occur via the major groove. These results are consistent with results of phasing experiments with *M.HaeIII* which showed the bending is toward the minor groove.

Construction of M.SssI variants for coupling with peptid nucleic acid or oligodeoxynucleotid

The ability to methylate DNA sequences playing a role in gene regulation may help to understand information generated by genomic sequencing. This task may be achievable by generation of methyltransferases with "programmable" specificities. In 2001, our group as a member of an international consortium won a research grant of the European Fifth Framework Programme for development of methyltransferases with programmable specificities. Oligodeoxynucleotid (ODN) and peptid nucleic acid (PNA) have the capacity form sequence-specific complexes with DNA. It is assumed that if ODN or PNA is covalently bound to a methyltransferase, the specificity of the conjugate will be in part determined by the sequence of the PNA/ODN tag. The aim is to introduce PNA/ODN-methylase conjugates into cultured cells and disrupt transcription of certain genes by selective methylation of their promoter. The PNA/ODN tag of the conjugate will make specificity of the methyltransferase programmable.

The *Spiroplasma* C5-cytosine methyltransferase, M.SssI was chosen as model enzyme for coupling with ODN or PNA. M.SssI has the lowest specificity (CG) among prokaryotic C5-methyltransferases, thus sequence specificity of the envisaged conjugates will be largely dependent on the "programming" ODNs or PNAs.

For coupling of PNA/ODN to the methylase, the structure of the enzyme is must be modified according to the specific requirements of the coupling reactions. Coupling using the bifunctional crosslinker requires a Cys residue placed at or close to the N or the C terminus of the molecule. Because any thiol group in the protein may react with the reagent, the protein should ideally not contain any other cysteine. Native chemical peptide ligation is dependent on a free cysteine thiol group at the amino terminus of the target protein, internal Cys residues, however, do not react.

First, we attempted to modify the original pCAL7 plasmid (obtained from New England Biolabs), which encodes wild type M.SssI. Unfortunately, neither the wild type, nor the mutant enzymes could be overproduced and purified to homogeneity. To facilitate purification, we decided to construct variants, in which M.SssI is fused to an affinity tag.

For native chemical peptid ligation we have made two M.SssI variants carrying the FLAG octapeptide at the N-terminus (FLAG-M.SssI and FLAG-M.Sss-74) and purified them to homogeneity using a FLAG affinity column. The FLAG-M.SssI-74 variant differs from FLAG-M.SssI, in that it has a C368A mutation and a C-terminal Cys. The FLAG fusion part could be removed by enterokinase cleavage resulting in N-terminal cysteine. Because of its C-terminal Cys pFLAG-MSss-74 in principle could be suitable for coupling using the bifunctional reagent without prior removal of the N-terminal affinity tail.

In another approach to generate an M.SssI variant carrying N-terminal cysteine, we mutated Ser2 to cysteine and cloned the modified gene in pBAD24 vector. This construct was made in the hope that the N-terminal formyl-methionine will be removed enzymatically in the *E.coli* cells resulting in N-terminal cysteine. For purification of this variant, an oligonucleotide encoding a 6xHis-peptide tag was added to the C-terminus of the SssI methyltransferase gene.

Two plasmid constructions (pETHis-MSssI, pETHis-MSss-74) based on the pET-His vector system were generated, but no significant overproduction of the 6xHis-tagged variants were obtained.

In several cases we observed that the cells died after induction of M.SssI production. We believed that the reason of toxicity was overmethylation of the DNA. To test this assumption, we generated an inactive variant of M.SssI by mutagenesis of the catalytic Cys residue. Surprisingly, this variant was also toxic for cells after protein induction. Presumably, the reason of toxicity was binding of the methyltransferase to the DNA. We suggest that the explanation of toxicity

is the binding of the SssI MTase to CG sites resulting in blockage of replication and transcription.

For the purpose of more effective purification we generated a "combined variant" (FLAG-M.Sss-6xHis-Cys), which carried the FLAG octapeptide at the N-terminus and a 6xHis-Cys peptide at the C-terminus. Advantage of this double-tagged variant is, that the second affinity tag will allow separation of the conjugate from free ODN/PNA.

In the course of this work, several plasmid expression vectors were tried to overexpress M.SssI and its mutant derivatives. The only vector to give substantial overproduction was pBAD24. We assume that the success of pBAD24 based plasmids could be the tight regulation of *araBAD* promoter.

One of the aims of our work is to purify M.SssI for X-ray crystallographic study. We hope that studies of the M.SssI structure will help us to understand the catalytic mechanism of the human methyltransferase which has similar specificity.

Tartalomjegyzék

oldalszám

Előszó.....	1.
--------------------	-----------

Irodalmi áttekintés

A DNS metiláció jelentősége.....	3.
A II. típusú metiltranszferázok.....	5.
A C5-citozin metiltranszferázok.....	7.
C5-citozin-metiltranszferázok röntgendiffrakciós modelljei.....	9.
A <i>HhaI</i> metiltranszferáz felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezeti modellje.....	9.
A <i>HaeIII</i> metiltranszferáz felismerőkomplexének röntgendiffrakciós szerkezeti modellje.....	11.
A DNS görbülete a specifikus fehérje-DNS kölcsönhatások során.....	12.
A DNS-görbítés kimutatása.....	13.
A DNS-görbülés irányának meghatározása.....	14.
A II. típusú metiltranszferázok DNS-görbítése.....	15.
A vizsgált metiltranszferázok néhány jellemzője.....	16.
“Programozható”specifitású SssI metiltranszferázok előállítása.....	18.

Anyagok és módszerek

Enzimek és reakciókörülmények.....	22.
Baktérium és fág törzsek.....	23.
A DNS-oldatok koncentrációjának meghatározása.....	24.
Plazmid DNS tisztítás.....	24.
Agaróz-gélelektroforézis.....	25.
Poliakrilamid gélelektroforézis.....	25.
DNS tisztítás agaróz-gélből.....	26.
DNS tisztítás poliakrilamid-gélből.....	26.

Plazmid DNS bejuttatása <i>Escherichia coli</i> sejtekbe.....	26.
Linkerek beépítése.....	27.
DNS szubsztátkészítés a gélretardációs módszerhez.....	28.
A permutációs gélretardáció reakciókörülményei.....	29.
DNS szubsztátkészítés "phasing" analízishez.....	30.
PCR reakciók és a T/A klónozás.....	32.
Helyspecifikus mutagenézis.....	33.
A fúziós SssI metiltranszferázok túltermelése.....	34.
Sejtextraktum készítése.....	35.
Az SssI-6xHis metiltranszferáz tisztítása heparin-agaróz oszlopkromatográfiával.....	35.
A fúziós metiltranszferázok tisztítása.....	35.
Metiltranszferáz aktivitás mérése.....	36.
Az eredmények értékelésénél felhasznált matematikai összefüggések.....	36.
A munkában használt oligonukleotidok.....	37.

Eredmények

A C5-citozin metiltranszferázok által kiváltott DNS görbület.....	38.
A permutált szerkezetű fragmentumok előállítása.....	38.
Gélelektroforetikus mobilitás vizsgálata cirkulárisan permutált fragmentumokkal.....	39.

Az SssI metiltranszferáz átalakítása oligonukleotidokhoz

és PNA-hoz való kapcsolás céljából.....	45.
---	-----

pCAL7-alapú konstrukciók.....	45.
Gly386Cys mutáns előállítása pCAL7-alapú plazmidban.....	46.
Cys368Ala mutáns előállítása pCAL7-alapú plazmidban.....	46.
Cys368Ala + Gly386Cys kettős mutáns előállítása pCAL7-alapú plazmidban.....	47.
A pFLAG-MAC plazmid alapú FLAG-M.SssI variáns előállítása.....	49.
Cys141Ser katalitikusan inaktív mutáns előállítása pFLAG-alapú plazmidban.....	51.
N-terminális 6xHis affinitásfarokkal ellátott variánsok előállítása.....	52.
A pBAD24 vector alapú FLAG-M.SssI plazmid létrehozása.....	55.

A C-terminális 6xHis fúziós M.SssI variáns létrehozása.....	58.
Ser2Cys mutáns előállítása pBFH-MSssI plazmidban.....	60.
 Megbeszélés.....	 63.
 Irodalmi hivatkozások.....	 70.
Summary.....	78.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Kiss Antalnak, aki lehetővé tette számomra, hogy csatlakozhattam a csoportjához. Köszönöm, hogy mindvégig nagy odafigyeléssel követte és irányította a szakmai munkámat.

Hálás vagyok Finta Csabának, amiért nagy türelemmel vezetett be a korszerű molekuláris biológiai technikák világába, hálával tartozom neki a segítő szándékú ötleteiért.

Köszönettel tartozom Slaska-Kiss Krystynának, aki az SssI metiltranszferáz variánsok elkészítésében nyújtott segítséget.

Köszönet Antonné Ibolyának és Csorbáné Erzsikének, akik a munka alapvető feltételeit teremtték meg számomra.

Rövidítések

C5-MTáz	- DNS C5-citozin metiltranszferáz
SAM	- S-adenozil-L-metionin
mcr	- methylated cytosine restriction
mrr	- methylation requiring restriction
ODN	- oligodezoxinukleotid
PNA	- peptid nukleinsav
Zf	- cink finger
LB	- Luria-Bertani táptalaj
TE	- 10 mM Tris-HCl pH 8,0 és 1 mM EDTA oldat
SAH, AdoHcy	- S-adenozil-L-homocisztein
SDS	- nátriumdodecil szulfát
BSA	- marha-szérumalbumin
PCR	- polimeráz láncreakció
EDTA	- etilén-diamin tetra-acetát
cpm	- (count per minute) percenkénti beütésszám
Kan ^r	-kanamicin rezisztens
PEG	- polietilén-glikol
ATP	-adenozin-trifoszfát
IPTG	- izopropil β -o-tiogalaktopiranozid
OD	- optikai denzitás
rpm	- (rotate per minute) percenkénti fordulatszám