

Tudományos eredmények összefoglalása

Bevezetés

A restriktív endonukleázok felfedezése mérföldkő volt a molekuláris biológia fejlődése szempontjából. Segítségükkel nyílt meg a lehetőség a DNS *in vitro* manipulálására, a génebézés kialakulására. Jelentőségüket a felfedezésükért és az első felhasználásukért 1978-ban Werner Arber-nak, Daniel Nathans-nek és Hamilton Smith-nek odaítélt orvosi Nobel díj is mutatja. Azóta a restriktív endonukleázoknak és az *in vitro* DNS-rekombinációt felhasználó kísérletekben manapság egyre fontosabbá váló modifikációs metiltranszferázoknak tisztítása és forgalmazása virágzó üzletág lett.

A restriktív-modifikációs rendszerek általában prokariótákban előforduló enzimrendszerek. Kétféle enzimaktivitás jellemzi őket: Az egyik egy szekvenciaspecifikus endonukleáz, amely bizonyos DNS szekvenciák előfordulása esetén hasítja a DNS mindkét szálát. A másik egy, az endonukleázzal azonos bázissorrendet felismerő metiltranszferáz, ami S-adenozil-L-metionint (SAM) használva metildonorként metilálja a felismerőszekvencia megfelelő bázisát, és így megvédi a DNS-t az endonukleáz hasításától (Wilson és Murray, 1991).

Funkciójuk valószínűleg az idegen genetikai anyag elleni védekezés (Price és Bickle, 1986). Újabban feltételezik, hogy úgynevezett "önző genetikai elemeként" viselkednek, ami a sejtben való megmaradásukat egyéb szelekciós hatás nélkül is lehetővé teszi (Naito és mtsai., 1995; Kulakauskas és mtsai., 1995).

A restriktív-modifikációs rendszereket alegységszerkezet, kofaktor igény, a felismerőhely szimmetriája és a DNS-hasítás helye alapján klasszikusan három csoportba szokták osztani (Yuan, 1981). Újabban még két külön csoportot különböztetünk meg (Wilson és Murray, 1991;



Janulaitis és mtsai., 1992). Mindegyik rendszer esetében SAM a metilforrás, az endonukleáz-aktivitáshoz pedig Mg^{2+} jelenléte szükséges.

Legnagyobb tudományos és gyakorlati jelentősége a II. típusú enzimeknek van. A nagyszámú és szigorú specifitás, a pontos, meghatározott helyen történő hasítás teszi őket az *in vitro* rekombináns-DNS-technika alapeszközeivé. A fentiekén túl egyszerű szerkezetük és kofaktorigényük miatt a szekvenciaspecifikus fehérje-DNS-kölcsönhatás vizsgálatának is kiváló alanyai.

A II. típusú rendszerek enzimei külön fehérjemolekulák. Az endonukleáz a hasításhoz csak Mg^{2+} -ot igényel, és a 4-8 bázispár (bp) hosszúságú szimmetrikus felismerőhelyen belül, mindig meghatározott helyen vágja a DNS mindkét szálát. Ez a meghatározott helyen történő hasítás teszi ezeket az enzimeket a molekuláris biológia nélkülözhetetlen eszközeivé. A metiltranszferáz működésének eredménye N^6 -metiladenin, N^4 -metilcitozin és C^5 -metilcitozin lehet (Wilson és Murray, 1991). Idetartoznak a molekuláris biológiai kísérletek szempontjából legfontosabb és így legismertebb rendszerek.

Mivel a II. típusú restrikciós-modifikációs rendszerek enzimei viszonylag rövid DNS szakaszokat (általában 4-8 bp) ismernek fel, és igen szigorú a specifitásuk (a felismerőszekvenciához képest egy bázisnyi eltérés az aktivitásuknak akár milliomod részére való csökkenéséhez is vezethet), ezért működésük jellemzése alkalmas a szekvenciaspecifikus fehérje-DNS-kölcsönhatás általános vizsgálatára is. További előnyt jelent széles körű elterjedésük, az ismert nagyszámú specifitás és legtöbbjük viszonylag egyszerű szerkezete.

A II. típusú metiltranszferázokat aszerint csoportosítjuk, hogy mely bázisokat és milyen pozícióban metilálnak. Így megkülönböztetünk N^6 -adenin, N^4 -citozin- és C^5 -citozin-metiltranszferázokat. A metiláció szempontjából fontosabb a létrehozandó kémiai kötés jellege, mint a

metilált bázis minősége: a kétfajta citozin-metiltranszferáz kevésbé hasonlít egymásra. Az N^4 -citozin-metiltranszferázok az ugyancsak exociklikus aminos csoportot metilező N^6 -adenin-metiltranszferázokkal mutatnak szerkezeti és valószínűleg működésbeli hasonlóságokat (Wilson és Murray, 1991).

Eddig közel 100 II. típusú metiltranszferáz és 60 endonukleáz aminosavsorrendjét határozták meg (Wilson, 1991).

Az eddig szekvenált mintegy 60 rendszer egyikében sem sikerült az endonukleáz és metiltranszferáz között hasonlóságot kimutatni, annak ellenére, hogy azonos DNS-szekvenciát ismernek fel. Ez azt mutatja, hogy az endonukleázok és metiltranszferázok eltérő mechanizmussal ismerik fel DNS-szubsztrátjukat, és valószínűleg különböző eredetűek (Wilson, 1991).

Az ismert aminosavsorrendű endonukleázok szekvenciáiban csak elvétve lehetett számottevő hasonlóságot kimutatni (Wilson és Murray, 1991).

Az endonukleázokkal szemben a metiltranszferázok elsődleges szerkezeteiben már ki lehet mutatni általános hasonlóságokat. Ez legkifejezettebb a C^5 -citozin-metiltranszferázok csoportjában, amelyek tíz konzervált motívumot tartalmaznak (Pósfai és mtsai., 1989). A konzervált szakaszok egymás utáni sorrendje állandó és minden C^5 -citozin-metiltranszferázban - még az eukarióta DNS-metiltranszferázban is - megtalálhatóak. A konzervatív motívumok funkciójának megismeréséhez nagymértékben hozzájárult a *HhaI* és *HaeIII* metiltranszferázok röntgendiffrakcióval megoldott szerkezete (Cheng és mtsai., 1993; Klimasauskas és mtsai., 1994; Reinisch és mtsai., 1995).

Az adenin-metiltranszferázok szerkezete kevésbé konzerválódott. Általánosan csak egy rövid állandó motívumot (DhVhX(N/D)PPYh, ahol *h* hidrofób és *X* bármilyen aminosav lehet) találunk bennük (Lauster 1989). Ugyanez mondható el az N^4 -citozin-metiltranszferázokról is, annyi

különbséggel, hogy itt inkább SPPY szekvencia fordul elő (Klimasauskas és mtsai., 1989).

Az összes II. típusú metiltranszferázban egy általánosan előforduló szakaszt lehet kimutatni (Lauster, 1989; Klimasauskas és mtsai., 1989). Ez a motívum (hh(D/S)(L/P)FXGXG, ahol *h* hidrofób, *X* pedig bármely aminosav lehet) általában jellemző a SAM-ot szubsztrátként használó enzimekre (Kagan és Clarke, 1994), valószínűleg a metildonor kötésében játszik szerepet. Ezt alátámasztják a *Hha*I és *Taq*I metiltranszferázok röntgendiffrakciós szerkezeti modelljei, ahol mindkettőben a SAM-kötő zseb része ez a fehérjerészlet (Cheng és mtsai., 1993; Labahn és mtsai., 1994).

A metiltranszferázok kétszubsztrátos enzimek. Egyik szubsztrátjuk a metilálандó felismerőszekvenciát tartalmazó DNS, míg a másik a metilcsoportot szolgáltató SAM. A szubsztrátokkal való kölcsönhatás jellemezhető indirekt módon: enzimkinetikai mérésekkel és számításokkal, valamint vizsgálható közvetlenül, molekuláris biológiai eszközökkel is. Több metiltranszferáz DNS-sel való kapcsolatát jellemezték gélretardációs (Dam: Bergerat és Guschlbauer, 1990; *M.Bsp*RI: Kovács, 1991; *M.Msp*I: Dubey és Roberts, 1992) és "foot-print" (*M.Msp*I: Dubey és Roberts, 1992, *M.Sss*I és *M.Hha*I: Renbaum és Razin, 1995) kísérletekkel. Néhány DNS-metiltranszferáz esetében sikerült az enzimet ultraibolya fény segítségével SAM-mal vagy annak 8-azido származékával (8-azido-S-adenozil-L-metionin) keresztkötni (Reich és Everett, 1990; Som és Friedman, 1990; Wenzel és mtsai., 1991; Ahmad és Rao, 1994). Ez a metildonorral való specifikus kapcsolat kimutatásán túl konkrét adatokat szolgáltat a SAM-kötőhely kialakításában résztvevő aminosavakról is (Reich és Everett, 1990; Som és Friedman, 1991; Wenzel és Guschlbauer, 1993).

A MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézetében dolgozó, Kiss Antal által irányított kutatócsoport a II. típusú restrikciós

endonukleázok és modifikációs metiltransferázok molekuláris szintű jellemzésével foglalkozik, különös tekintettel a DNS-sel való szekvenciaspecifikus kölcsönhatásra. Ennek során egy olyan enzimcsaládot vizsgálnak, melynek tagjai az 5' GGCC 3' és az ezzel rokon bázissorrendeket ismerik fel. Több endonukleáz és metiltransferáz génjét klónozták, a klónozott gének nukleotidsorrendjét meghatározták. Számos enzim túltermeltetése és homogenitásig való tisztítása szintén megoldott.

Ezen kutatási program keretében került sor többek között *Klebsiella pneumoniae* egy klinikai törzséből izolált, az 5' GGTACC 3' bázissort felismerő *KpnI* rendszerbe tartozó *KpnI* metiltransferáz jellemzésére, és *Bacillus subtilis* R törzséből izolált, 5' GGCC 3' szekvenciaspecifitású *BspRI* metiltransferáznak a SAM-mal való kölcsönhatásának vizsgálatára és ugyanezen enzim DNS kötésének footprint kísérletekkel történő jellemzésére.

Célkitűzések

1. A *KpnI* metiltransferáz jellemzése

Munkánk kezdetekor ismeretlen volt a *KpnI* metiltransferáz elsődleges szerkezete, ezért első célunk a *KpnI* metiltransferáz aminosavsorrendjének meghatározása volt. Ehhez legegyszerűbben a génjének klónozásával, és a gén bázissorrendjének meghatározásával juthatunk. A *kpnIM* gén nukleotidsorrendjének ismeretében lehetőség nyílt az enzim túltermeltetésére és nagyobb mennyiségben való tisztítására. A tisztított metiltransferáz felhasználásával már vizsgálható volt a szubsztrátokkal való kölcsönhatás. Kíváncsiak voltunk, hogy ki lehet-e mutatni enzim-DNS és enzim-SAM komplexeket. Ez az enzim-szubsztrát kötés vizsgálatának alapvető feltétele, és a távolabbi jövőben tervezett

enzim-szubsztrát komplex (*M.KpnI*-SAM és *M.KpnI*-DNS) röntgendiffrakciós szerkezetvizsgálatához is elengedhetetlen.

2. A *BspRI* metiltranszferáz önmetilézése során keletkező modifikált aminosav meghatározása

Az 5' GGCC 3' felismerőhelyű *BspRI* C⁵-citozin-metiltranszferáz a metildonor S-adenozil-L-metionint felhasználva képes önmagát metilezni. A [metil-³H]SAM-mal metilezett enzim proteolitikus emésztéséből kapott radioaktív peptidek szekvenenciaanalízisével nagyjából azonosítani lehetett a fehérjéhez kötődő metilcsoport helyét. Kérdéses volt, hogy a metilcsoport mely aminosav(ak)hoz kötődik. Hogy ezt kiderítsük, konkrétan azonosítottuk a *BspRI* metiltranszferáz önmetilézése során keletkező metilált aminosavakat.

3. A *BspRI* metiltranszferáz DNS-kötésének vizsgálata

Az 5' GGCC 3' felismerőhelyű *BspRI* metiltranszferáz DNS-szubsztrátjával való kölcsönhatását kívántuk footprint kísérletekkel jellemezni. Különböző DNS-hasítási módszereket használva, így a DNS-t különböző funkciós csoportokon támadva, a metiltranszferáz-DNS komplex különböző pontjai térképezhetők. A szekvensziaspecifikus DNS-kötés kimutatására és a metiltranszferáz által lefedett DNS-szakasz hozzávetőleges meghatározására a DNázI footprint módszert használtuk. A nagyárokban levő kölcsönhatásokat dimetilszulfáttal végzett metilációs védelemmel vizsgáltuk. A kisárki kölcsönhatások vizsgálatára a DNS kisárkába kötődő 1,10-fenantrolin-Cu(II)-et míg a foszfát-cukor láncsal való kapcsolatok kimutatására a hidroxilgyökös footprint módszert használtuk.

Eredmények

1. A *KpnI* metiltranszferázt kódoló gén klónozása

A *KpnI* metiltranszferázt a II típusú metiltranszferázok klónozására általánosan használt szelekcióval, a klónok *in vivo* metiltranszferáz-aktivitására szelektálva klónoztuk. A módszer elve a következő. A klónozendó metiltranszferázt tartalmazó baktérium DNS-éből megfelelő klónozó vektorban (általában plazmidban) klóntárat készítünk. A klónozni kívánt metiltranszferáz felismerőhelyét a vektornak tartalmaznia kell. A rekombináns plazmidokat hordozó baktériumokból plazmidot tisztítunk. Az így nyert plazmidkeveréket emésztjük a megfelelő endonukleázzal. Ezt az emésztést csak azok a plazmidok élik túl, amelyek a megfelelő felismerőhelyeken metilálva vannak, tehát bennük van, és ki is fejeződik a metiltranszferáz génje. Ezeket a plazmidokat egy, az emésztést követő transzformációval egyszerűen megkaphatjuk. A módszer eredményességének alapvető feltétele, hogy a klónozó vektorban a metiltranszferáz felismerőhelye minél nagyobb számban legyen jelen. Mivel az általánosan elterjedt klónozó vektorokban vagy egy *KpnI* hely van, vagy nincsen egy sem, ezért a klónozáshoz egy általunk készített plazmidot használtunk. Ezt pBR322 plazmidból készítettük, úgy, hogy annak három egyedi hasítóhelyére egy-egy *KpnI* linkert építettünk. A három hely a pBR322-ben egyszer előforduló *BaI*, *PvuII* és *SspI* helyek voltak. Az így keletkezett, három *KpnI* hasítóhelyet tartalmazó plazmidot pLZS3-nak neveztük el.

BamHI-gyel linearizált, majd bakteriális alkalikus foszfatázzal kezelt pLZS3 plazmidba *Sau3AI* enzimmel részlegesen emésztett *Klebsiella pneumoniae* DNS-fragmentumokat ligáltunk. Ebből a klóntárból a fent részletezett szelekciót elvégezve izoláltunk egy klónt, amiben a

rekombináns plazmid védett volt *KpnI* emésztéssel szemben. Azt, hogy az izolált klón valóban tartalmazza a *KpnI* metiltranszferázt az alábbi módon bizonyítottuk:

1. Nemcsak a plazmid, hanem a sejtekből tisztított kromoszómális DNS is védett volt *KpnI* emésztéssel szemben.

2. A plazmidból a beépített fragmentumot kivágva a vektor *KpnI*-gyel emészthetővé vált, bizonyítva, hogy a rekombináns plazmid *KpnI* endonukleázzal szembeni védettségét nem a plazmidon levő felismerőhelyek megváltozása vagy eltűnése, hanem metilációja okozta.

3. A rekombináns plazmidot hordozó baktériumok sejtkivonatából *KpnI* metiltranszferáz-aktivitást lehetett kimutatni (Kiss és mtsai., 1991).

A rekombináns plazmidot hordozó sejt fágrestrikciót nem mutatott. A baktérium sejtkivonatában sem tudunk endonukleáz-aktivitást kimutatni. Ebből arra következtettünk, hogy az endonukleáz génjét - legalábbis teljes, működő formájában - nem tartalmazza a klónozott DNS-fragmentum.

Módszerek:

A *KpnI* metiltranszferáz klónozásához használt pLZS3 vektort a pBR322 plazmid módosításával készítettük.

A *KpnI* metiltranszferázt *Escherichia coli* ER1398 törzsben klónoztuk. A baktériumok tenyésztése Luria-Bertani táptalajban (LB) történt 37 °C-on, amit szükség esetén 100 µg/ml ampicillinnel vagy 12,5 µg/ml tetraciklinnel egészítettünk ki. A baktériumok lemezen való növesztéséhez 1,5 % agart tartalmazó LB táptalajt használtunk (Sambrook és mtsai., 1989).

A klónozás során felhasznált restrikciós endonukleázok, T4 DNS-ligáz, bakteriális alkalikus foszfatáz és T4 polinukleotid kináz használatánál a gyártó által megadott reakciókörülményeket alkalmaztuk.

A *Klebsiella pneumoniae* össz-DNS tisztítása az SDS/proteináz K lízis módszerével történt (Silhavy és mtsai., 1984)

A baktériumok transzformációját a Lederberg és Cohen által leírt CaCl_2 -os módszerrel végeztük (Lederberg és Cohen, 1974).

A fágrestrikció vizsgálatához LB lemez felületére 300 μl 10 mM Tris.HCl pH7,5, 10 mM MgCl_2 , 5 μl λ_{vir} , 5 μl $\Phi 80_c$ (mindkét fáguszuspenzió koncentrációja kb. 10^8 fág/ μl) oldatot kentünk, majd 1-1,5 μl sűrű baktériumkultúrát cseppentettünk a lemezre. Pozitív - fágrestrikciót mutató - kontrollnak pSU19 plazmidot (Kiss és mtsai., 1985) tartalmazó *E. coli* ER1398 törzset használtunk.

A plazmid-DNS tisztítás, a *KpnI* linkerek beépítése és a DNS-minták agaróz-gélelektroforézise a rekombináns-DNS technikákat alkalmazó kísérletekben rutinszerűen alkalmazott standard módszerek szerint történt (Sambrook és mtsai., 1989).

2. A *KpnI* adenin-metiltranszferáz

Az irodalomban ellentmondó eredmények voltak a *KpnI* metiláció helyével kapcsolatban. Egyes szerzők adenin-metilációt (Hammond és mtsai., 1990), mások N^4 -citozin-metilációt (Nelson és McClelland, 1989) valószínűsítettek. Megvizsgáltuk a *KpnI* szerint modifikált 5' GGTACCCGGG 3' szekvenciában (aláhúzva a *KpnI* felismerőhelye) a *KpnI* felismerőhellyel átfedő *MspI*, *HpaII* (5' CCGG 3') és *SmaI* (5' CCCGGG 3') hasítóhelyek emészthetőségét. A *KpnI* metiltranszferázt szubklónoztuk pUC19 plazmidban, és az ebből izolált 837 bp nagyságú - a pUC19 plazmid polilinkerét tartalmazó - fragmentumot emésztettük *SmaI*, *MspI* és *HpaII* enzimekkel. Az irodalomból ismert volt, hogy az m^5CCCGGG , m^4CCCGGG és $\text{C}^{\text{m}^4}\text{CCGGG}$ módon metilált szekvenciát nem hasítja a *SmaI* endonukleáz. Az m^4CCGG modifikált felismerőhely védett a *HpaII*, az m^5CCGG szekvencia pedig az *MspI* emésztés ellen (Nelson és McClelland, 1989). Mivel mind a három enzim hidrolizálta a DNS-t a fenti, *KpnI* emésztéssel szemben védett szekvenciánál, csak az adenin lehet a metilált bázis (Kiss és mtsai., 1991).

Módszerek:

A *KpnI* metiláció helyének meghatározásához a metiltranszferázt pUC19 plazmidban szubklónoztuk.

A restrikciós emésztéssel létrehozott, izolálni kívánt DNS-fragmentumot agarózgélből DE81 (DEAE-cellulóz) papírba futtattuk, majd arról 2X100 µl 10 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl oldattal eluáltuk.

A kísérletek során alkalmazott egyéb módszerek: plazmid-DNS-tisztítás, restrikciós emésztések, DNS-minták agaróz gélelektroforézise az 1. pontban leírt módon történt.

3. A *kpnIM* gén nukleotidsorrendjének meghatározása

Elvégeztük a klónozott 5,3 kb nagyságú fragmentum fizikai térképezését, és különböző szubklónok *in vivo* metiltranszferáz-aktivitásának vizsgálatával megállapítottuk, hogy a *kpnIM* gén a klónozott fragmentum szélén, egy körülbelül 1450 nukleotid nagyságú szakaszon helyezkedik el. A Sanger-féle láncterminációs módszer segítségével meghatároztuk ennek az 1441 bp hosszúságú fragmentumnak a bázissorrendjét. A szekvencia tartalmaz egy nyitott leolvasási keretet, amely - ismerve a II. típusú metiltranszferázok átlagos hosszát (3-400 aminosav) - megfelelő nagyságú a *KpnI* metiltranszferáz kódolására. A szekvencia 5' részén három lehetséges transzlációs kezdőpont van. A három transzlációs startpont közül csak az egyik előtt található a konszenzus, riboszómakötő Shine-Dalgarno szekvencia (Shine és Dalgarno, 1975), a fehérje transzlációja valószínűleg ezzel a metioninnal kezdődik. Így a gén bázissorrendje alapján a *KpnI* metiltranszferáz 417 aminosav hosszúságú, relatív molekulatömege 47.582 Da.

A *KpnI* metiltranszferáz rendelkezik az adenin-metiltranszferázokban általánosan megtalálható DPPY motívummal (Lauster, 1989) és a SAM-ot használó enzimekre jellemző FXGXG

motívummal (*X* bármilyen aminosav lehet) (Kagan és Clarke, 1994). Vizsgáltuk a *KpnI* metiltransferáz aminosav-szekvenciája és az eddig ismert adenin-metiltransferázok aminosavsorrendje közötti esetleges további hasonlóságokat. A már említett, adenin-metiltransferázokra általánosan jellemző, rövid, konzervált szakaszokon kívül homológiát egyik esetben sem találtunk.

Módszerek:

A *kpnIM* gén nukleotidsorrendjének meghatározásához a klónozott *K. pneumoniae* DNS fragmentumait M13mp18 és M13mp19 fágokban szubklónoztuk. A bakteriofágok gazdájának *Escherichia coli* JM109 vagy *Escherichia coli* XL1-Blue törzset használtunk.

A bakteriofágok fágok lemezen való tenyésztéséhez 0,7 % agart tartalmazó LB táptalajt használtunk.

A nukleotidsorrend meghatározásához használt M13mp18-ban és M13mp19-ben készített *kpnIM* szubklónok egy részét exonukleáz III-mal végzett egyirányú delécióképzéssel készítettük (Henikoff, 1987).

Az M13mp18 és M13mp19-ben készített szubklónok bázisrendjének meghatározását a Sanger-féle láncterminációs módszerrel (Sanger és mtsai., 1977; Sambrook és mtsai., 1989) végeztük. Az *in vitro* szintetizált komplementer szál jelölésére [$\alpha^{35}\text{S}$]dATP-t használtunk (Biggin és mtsai., 1983).

Az M13 bakteriofágok egyes- és kettősszálú formájának tisztítása, baktériumsejtek M13 bakteriofág kettősszálú formájával való transzformálása, a bakteriofágok tenyésztése leírt, standard módszerek szerint történt (Sambrook és mtsai., 1989).

A plazmid-DNS tisztítás, baktériumsejtek plazmiddal való transzformálása restriktációs emésztések, DNS-minták gélelektroforézise az 1. pontban leírtaknak megfelelően történt.

4. A *KpnI* metiltranszferáz tisztítása

A *KpnI* metiltranszferázt a T7 expressziós rendszerben túltermeltettük (Tabor és Richardson, 1985). Ehhez a *kpnIM* gént a T7 bakteriofág $\Phi 10$ promótere mögé szubklónoztuk. Túltermeltetéshez gazdának *Escherichia. coli* BL21(DE3)-t törzset használtunk, amelyben a kromoszómán az indukálható *lac* promóter mögé építve található a T7 RNS-polimeráz génje. Az *Escherichia. coli* BL21(DE3)-ban túltermeltetett metiltranszferázt három egymást követő kromatográfiás oszlopon homogenitásig tisztítottuk. A tisztítás menete a következő volt: A French-pressel feltárt sejtek kivonatát először Bio-Gel-0.5m gélszűrő oszlopon kromatografáltuk. Az összegyűjtött aktív frakciókat foszfozellulóz oszlopra töltöttük, majd a kötődő fehérjéket növekvő $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradienssel eluáltuk. Az enzimaktivitást mutató frakciókat összeöntöttük, és fenil-agaróz oszlopra töltöttük. Az oszlophoz kötődő fehérjéket csökkenő $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gradienssel eluáltuk. Az SDS-poliakrilamid-gélelektroforézissel homogénnek talált frakciókat összegyűjtöttük, majd heparin-agaróz vagy hidroxil-apatit oszlopon koncentráltuk (Finta és mtsai., 1995).

Módszerek:

Az enzim túltermeltetése a következőképpen történt: A sejteket 37 °C-on 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillint tartalmazó LB táptalajban növesztettük. A *KpnI* metiltranszferáz termeltetését 0,2 % laktóz vagy 1 mM izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid hozzáadásával indukáltuk, $\text{OD}_{550}=1$ sejtsűrűségénél. Az induktor hozzáadása után a sejteket 37 °C-on további 6 órán keresztül rázattuk.

A *KpnI* metiltranszferáz-aktivitást a tisztítás során 50 μl 50 mM Tris.HCl pH7,8, 1 mM β -merkaptoetanol oldatban mértük, 5 μM [metil- ^3H]SAM-ot (specifikus aktivitása 50 Bq/pmol) használva metilforrásként. DNS-szubsztrátnak 200 nM pLZS3 plazmidot, vagy 1 μM kettősszálú egy *KpnI* felismerőhelyet tartalmazó szintetikus oligonukleotidot használtunk (O25) (nukleotidsorrendje: 5'

GGCACGAGGGTACCAGGTCCAGACG 3' és az ezzel komplementer szál; a szekvenciában aláhúzással jelöltem a *KpnI* felismerőszekvenciáját). A reakció 37 °C-on, 2-30 percig tartott, és 6 µl 1 %-os SDS hozzáadásával állítottuk le. 50 µl-t 3 cm²-es DE81 korongra cseppentettünk, és az el nem reagált SAM-ot 50 mM Na₂HPO₄-os (3X10 perc), majd etilalkoholos mosással (2X10 perc) kimostuk a filterből. A korongon levő radioaktivitást toluol alapú szcintillációs koktélaban mértük.

A fehérjék elválasztásához 10-15 %-os vertikális SDS-poliakrilamid-géleket használtunk. A fehérjéket Coomassie Brilliant Blue R250 festékkel festettük (Sambrook és mtsai., 1989).

A DNS-oldatok koncentrációját spektrofotometriásan határoztuk meg. Plazmid-DNS esetében az $A_{260}=1$ abszorpciót 50 µg/ml DNS-koncentrációnak feleltettük meg (Sambrook és mtsai., 1989). Egyesszálú oligonukleotidok esetében a megfelelő extinkciós koefficiens kiszámítása az oligonukleotidot alkotó nukleotidok számának és minőségének figyelembe vételével történt (Fasman, 1975).

A fehérjekoncentráció meghatározása Bradford módszerével (Bradford, 1976) történt. Standardként marha-szérumalbumint (BSA) használtunk.

5. A *KpnI* metiltranszferáz kölcsönhatása DNS szubsztrátjával

Megvizsgáltuk a *KpnI* metiltranszferáz stabilitását optimális reakciókörülmények között. Ehhez az enzimet 37 °C-on inkubáltuk, meghatározott időközönként mintát vettünk, és a megfelelő szubsztrát(ok) (DNS és/vagy [metil-³H]SAM) hozzáadása után metiltranszferáz-aktivitást mértünk. Szubsztrát jelenléte nélkül az enzim folyamatosan inaktiválódott, 30 perces inkubálás után nagyjából a kiindulási aktivitás felét mértük. Hasonló inaktiválódást tapasztaltunk akkor is, ha az enzimet SAM jelenlétében inkubáltuk. A *KpnI* felismerőhelyet tartalmazó DNS az enzimet megvédte az inaktiválódástól, és ugyanilyen hatása volt a felismerőhelyet nem tartalmazó DNS-nek is. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az enzim a metildonor jelenléte nélkül is kölcsönhatásba lép a DNS-sel, bár ez a kötés nem biztos, hogy specifikus.

Módszerek:

A tisztított metiltransferáz jellemzése során az enzimaktivitást 50 μ l 50 mM MOPS pH7,0, 50 mM NaCl, 1 mM β -merkaptoetanol, 5 % glicerin, 150 nM *KpnI* metiltransferáz, 1 μ M O25 oligonukleotid (4. pont) és 3 μ M [metil-³H]SAM (50 Bq/pmol) tartalmú oldatban mértük 37 °C-on 5 percig. A DNS-be beépült radioaktivitást a 4. pontban részletezett módon határoztuk meg.

A fehérje és DNS koncentráció meghatározása ugyanúgy történt, mint a 4. pontban.

6. A *KpnI* metiltransferáz kölcsönhatása a SAM-mal

A *KpnI* metiltransferáz SAM kötésének vizsgálatára alkalmasnak bizonyult az enzim rövid hullámhosszúságú ultraibolya (UV) fényel végzett besugárzása [metil-³H]SAM jelenlétében. Az UV besugárzás keresztkötést hozott létre az enzim és a SAM között. A [metil-³H]SAM-mal keresztkötött enzimet SDS-poliakrilamid-gél-elektroforézist követő fluorográfiával illetve filterkötéssel is ki tudtuk mutatni. A metiltransferázhoz kapcsolódó radioaktív jelet 1 % SDS és 1 M β -merkaptoetanol jelenlétében végzett 2 perces forralással, vagy a fehérje triklór-ecetsavval való kicsapásával nem lehetett eltávolítani. Ez arra utalt, hogy a jelölődés kovalens kötés eredménye. Ha a besugárzásnál a karboxilcsoportban ¹⁴C-nel jelzett SAM-ot használtunk (S-adenozil-L-[karboxil-¹⁴C]metionin), szintén kaptunk radioaktív jelbeépülést. Ezért valószínű, hogy az UV fény hatására az egész SAM molekula hozzákötődött a metiltransferázhoz.

A *KpnI* metiltransferáz és SAM közötti keresztkötés az enzim és a metildonor specifikus kölcsönhatásának eredménye. Ezt a következő eredmények igazolják:

1. A keresztkötött termék megjelenéséhez natív enzimre volt szükség.
2. Nem keletkezett radioaktív termék UV fényel való kezelés nélkül.

3. Hasonló körülmények között egy SAM-ot nem kötő fehérjét, BSA-t nem tudtuk keresztkötni a [metil-³H]SAM-mal.

4. A jelölést SAM analógok (S-adenozil-L-homocisztein és sinefungin), a metiltranszferáz-reakció általánosan használt kompetitív inhibitorai gátolták (Finta és mtsai., 1995).

Módszerek:

Az enzim SAM-mal való keresztkötését 30 µl 50 mM MOPS pH7,0, 50 mM NaCl, 5 mM β-merkaptotanol, 5 % glicerin, 150 nM *M.KpnI*, 0,6 µM [metil-³H]SAM (3,1 kBq/pmol) tartalmú oldatban végeztük. Az UV fénnnyel való besugárzás TOKIG6T5 germicid lámpával, 6 cm távolságból, szobahőmérsékleten, általában 15 percig történt.

A metiltranszferázba beépült radioaktív jel fluorográfias kimutatása a következőképpen történt: Besugárzás után a mintákhoz 1/5. térfogat (tf) 325 mM Tris.HCl pH6,8, 10 % SDS, 5 M β-merkaptotanol, 50 % glicerin és 0,1 % brómfenolkék tartalmú mintapuffert adtunk, majd 2 percig 100 °C-on inkubáltuk. Az így denaturált metiltranszferázt 10 %-os SDS-poliakrilamid-gélen végzett elektroforézissel választottuk el a feleslegben maradt SAM-tól. A gélt ezután 30 percig izopropanol/ecetsav/víz (25:10:65) keverékében fixáltuk. A fixált gélt 30 percig szcintillátor folyadékban (Amplify, Amersham) áztattuk, majd megszárítottuk, és -70 °C-on 5 napig fluorografáltuk.

A fehérjébe beépült radioaktív jel DE81 filterkötéssel való detektálása a következőképpen történt: Az UV-vel kezelt mintákhoz 1 tf 500 mM Na₂HPO₄ oldatot adtunk, majd 3 cm²-es DE81 korongra cseppentettük. A nem kötődött SAM-ot a metiltranszferáz-aktivitás mérésénél már részletezett Na₂HPO₄-os, etilalkoholos mosással távolítottuk el. A beépült radioaktivitást toluol alapú szcintillációs koktéltban mértük.

A fehérje- és DNS-koncentráció meghatározása ugyanúgy történt, mint a 4. pontban.

7. A *BspRI* metiltranszferáz önmetilézése során modifikált aminosav azonosítása

A *BspRI* metiltranszferáz DNS jelenléte nélkül képes önmagát metilezni a metildonor SAM felhasználásával (Szilák és mtsai., 1994). A [metil-³H]SAM-mal radioaktívan jelölt enzim tripszines és kimotripszines emésztésével kapott peptideket egymástól elválasztva három radioaktív oligopeptidet lehetett izolálni. Meghatározva a tisztított oligopeptidek aminosavsorrendjét azonosítani lehetett a három peptid helyzetét a *BspRI* metiltranszferáz aminosavszekvenciájában. Kiderült, hogy a három peptid közül kettő egymással átfedő, tehát feltételezni lehetett, hogy az önmetilézési reakció során a metiltranszferáz két aminosavja jelölődött. Ezek után eldöntendő kérdés maradt, hogy mely aminosav(ak) hordozzák a radioaktív metilcsoportot. Ehhez karboxipeptidáz-Y enzimmel aminosavakra hidrolizáltuk az izolált peptideket, majd az aminosavakat szilikagél vékonyrétegen elválasztottuk. A radioaktív jel mindhárom peptid esetében a standardként használt metilciszteinnel futott együtt. Ha a peptidek hidrolizálásával kapott aminosavakat H₂O₂-dal oxidáltuk, akkor a vékonyrétegen a radioaktív jel a standardként felvitt metil-ciszteinszulfonsavval együtt vándorolt. Ezek után nyilvánvaló volt, hogy a *BspRI* metiltranszferáz önmetilézésének eredménye metilcisztein. A fehérjében levő három cisztein közül kettő metileződik. A radioaktív peptidek térképhelyzetének ismeretében megállapíthattuk, hogy a *BspRI* metiltranszferáz a Cys₁₅₆ és Cys₁₈₁ aminosavakon metileződik. A Cys₁₅₆ metileződése azért meglepő, mert ez a C⁵-citozin-metiltranszferázokban erősen konzervált aminosav a metilcsoport DNS-re való átvitelében központi szerepet játszik, a katalízis egyik legfontosabb szereplője (Wu és Santi, 1987). Metilálásával az enzim saját magát inaktíválja (Szilák és mtsai, 1994).

Módszerek:

A tisztított radioaktív peptideket (4000 cpm) 300 µg/ml karboxipeptidáz Y-nal emésztettük 25 °C-on, 18 órán keresztül 100 mM trietilammónium-acetát pH5,0 oldatban. Az emésztményt liofilizáltuk, majd 1-2 µl vízben oldottuk, és az aminosavakat szilikagél vékonyréteg-kromatográfiával elválasztottuk. A kromatogramot butanol:ecetsav:víz (4:1:1) elegyében fejlesztettük ki. Standardként S-adenozil-L-metilciszteint használtunk. Ninhidrines festés után a lemezről a szilikagélt 5X10 mm-es darabokban lekapargattuk, és radioaktivitásukat liquid szintillációs koktélaban meghatároztuk.

Az oxidált származék előállításához a mintákat 5 % H₂O₂-dal 25 °C-on 2 órán keresztül kezeltük.

7. A *Bsp*RI metiltranszferáz-DNS kölcsönhatás vizsgálata footprint kísérletekkel

A *Bsp*RI metiltranszferáz-DNS kölcsönhatás vizsgálatára négyféle footprint technikát használtunk. Szubsztrátként pBR322 plazmidből izolált, egy *Bsp*RI felismerőhelyet (5' GGCC 3') tartalmazó, 152 bázispár hosszúságú fragmentum szolgált.

1. Footprint DNáz I-gyel

A metiltranszferáz által lefedett DNS-szakasz becslését DNázI footprint kísérletekkel végeztük. A metiltranszferáz felismerőhelyén kívül még több nukleotidot is védett DNázI hasítással szemben mind 3' mind 5' irányban. (Az egyik szálon 5' irányban 4-5, 3' irányban 8-9, míg a másik szálon 5' irányban 7, 3' irányban 8-9 nukleotid volt védett a felismerőhelyen kívül.) A védett régió a felismerőhelyhez viszonyítva aszimmetrikus volt. A metiltranszferáz-DNS-komplex footprintben a felismerőhelytől 5' irányban, 10 illetve 9 nukleotid távolságban mindkét

szálon egy-egy DNÁZI emésztésre különösen érzékeny hely jelent meg. Ez a DNS-nek az enzim hatására bekövetkező konformációváltozását jelzi.

2. Footprint dimetilszulfáttal

A DNS nagyárcában levő kapcsolatok vizsgálatára a dimetilszulfáttal végzett metiláció elleni védelést használtuk. A dimetilszulfát metilálja a guaninnak a nagyárokban levő N7 és az adeninnek a kisárokban lévő N3 atomját. A metilált guaninoknál a DNS piperidines kezeléssel elhasítható (Maxam és Gilbert, 1980). A *Bsp*RI metiltranszferáz felismerőhelyében mindkét szálon mindkét guanint megvédte a dimetilszulfáttal való metilezéstől, ami azt mutatja, hogy az enzim a nagyárok felőli oldalon közel kerül a DNS-hez. Az egyik szálon a felismerőhelytől 5' irányban, a 2 és 3 nukleotid távolságban levő guaninok az enzim kötődésének hatására fokozott érzékenységet mutattak a dimetilszulfáttal való metilezésre. Ez a DNS-nek az enzim hatására bekövetkező konformációváltozását jelzi.

3. 1,10-fenantrolin-Cu(II) védelem

Az 1,10-fenantrolin-Cu(II)-komplex a DNS kisárcába kötődik, és a DNS bázissorozatától függetlenül hasítja a cukor-foszfát gerincet (Papavassiliou, 1995). Ezt a reagenst használva nem kaptunk védelmet a *Bsp*RI metiltranszferázzal. Ez azt jelenti, hogy a *Bsp*RI DNS-kötésében a kisárki kapcsolatoknak valószínűleg nincsen, vagy csak elenyésző szerepe van.

4. Hidroxilgyökös footprint

A H_2O_2 Fe(II)-vel történő redukciója során keletkező hidroxilgyökök a DNS gerincében levő dezoxiribóz C4' atomját támadva hasítják a DNS-t (Papavassiliou, 1995). A *Bsp*RI metiltranszferáz mindkét szálon a felismerőhelyén túl 3' irányban még további 2 nukleotidot védett meg a

hasítástól. A hidroxilgyökös footprint azt mutatja, hogy a metiltranszferáz által kötött DNS-szakasz a felismerőhelyhez viszonyítva aszimmetrikus.

Eddig két C⁵-citozin-metiltranszferázzal végeztek hidroxilgyökös footprint kísérleteket (Renbaum és Razin, 1995). Ez a két enzim az 5' CG 3' felismerőhelyű *SssI* és az 5' GCGC 3' felismerőhelyű *HhaI* metiltranszferáz volt. Összehasonlítva a fenti két enzim és a *BspRI* metiltranszferáz footprintjeit szembeötlő a komplexek különbözősége. A *BspRI* metiltranszferáz felismerőszekvenciáján túl még további két nukleotidot véd felismerőhelyétől 3' irányban. Ezzel szemben az *SssI* és *HhaI* metiltranszferázok által védett régió a felismerőhelyeken kívül egy attól 5' irányban elhelyezkedő szakaszt foglal magába, és az egész védett szakasz hosszabb, mint a *BspRI* esetében tapasztalt. Ugyanakkor a *BspRI* footprint kiterjedése és a felismerőszekvenciához viszonyított elhelyezkedése megfelel azoknak az enzim-foszfát kapcsolatoknak, melyeket a *BspRI*-gyel azonos specifitású *HaeIII* metiltranszferáz-DNS-komplex röntgendiffrakciós szerkezetében leírtak (Reinisch és mtsai., 1995). Ez azt mutatja, hogy a *BspRI* metiltranszferáz feltehetőleg hasonló módon kötődik DNS-szubsztrátjához, mint az ugyanazt a szekvenciát felismerő *HaeIII* metiltranszferáz.

Módszerek:

A DNS szubsztrát preparálása

A footprint kísérletekhez a pBR322 plazmid 152 bp nagyságú, egy *BspRI* helyet tartalmazó *BamHI-NheI* fragmentumját használtuk. A DNS fragmentumot egyik végén radioaktívan jelöltük. Ehhez a pBR322 plazmidot *BamHI* vagy *NheI* endonukleázzal emésztettük, a keletkezett fragmentum végeit *E. coli* DNS polimeráz Klenow fragmentjével deoxiadenozin-5'- α -(³²P)-trifoszfát-ot használva feltöltéssel jelöltük. Ezután a DNS-t emésztettük a másik endonukleázzal (*NheI*-gyel vagy *BamHI*-gyel), majd a 152 bp nagyságú fragmentumot agarózgélből tisztítottuk.

A *Bsp*RI metiltranszferáz-DNS kötési reakció

A *Bsp*RI metiltranszferáz DNS kötési reakciója 25 µl térfogatú 50 mM Tris-Cl pH 8,0, 10 mM EDTA, 7 mM β-merkaptóetanol, 4 µM sinefungin és 8 ng/µl poly(dI·dC) oldatban történt, amely tartalmazott 6nM egyik végén radioaktívan jelölt *Bam*HI-*Nhe*I fragmentumot (50.000-200.000 cpm) és 0-2 µM *Bsp*RI metiltranszferázt. A kötési reakció szobahőmérsékleten 5 percig folyt.

Footprint DNázI-gyel

A DNázI védés során az enzim-DNS komplexhez 5 µl 15 mM CaCl₂, 60 mM MgCl₂ és 5 ng/µl DNázI oldatot adtunk. Egy perces szobahőmérsékleten történt inkubálás után a reakciót a minta fenolos extrakciójával állítottuk le, majd a DNS-t kétszer etanollal kicsaptuk.

Footprint dimetilszulfáttal

Az enzim-DNS komplexhez 1 µl 10%-os dimetilszulfátot adtunk. Három perces szobahőmérsékleten történt inkubálást követően a reakciót 6 µl 1,5 M nátrium-acetát pH 7,0, 1 M β-merkaptóetanol és 250 µg/ml tRNS hozzáadásával állítottuk le. A DNS-t kétszer kicsaptuk, majd 150 µl 1 M piperidinben oldottuk. A DNS hasításához a mintát 90 °C-on inkubáltuk 30 percen keresztül. A piperidin eltávolítása n-butanolos extrakcióval történt, majd a mintát liofilizáltuk.

Hidroxilgyökös footprint

Az enzim-DNS komplexhez 2 µl 75 mM Fe(II)-EDTA, 2 µl 150 mM aszkorbinsav és 1 µl 0,3 % H₂O₂ oldatot adtunk. A reakció szobahőmérsékleten három percen keresztül folyt, majd 90 µl 3 % glicerin, 0,13 M nátrium-acetát pH 7,0 és 92 % etanol hozzáadásával állítottuk le. A DNS-t fenolos extrakció után etanollal ismét kicsaptuk.

Footprint 1,10-fenantrolin-Cu(II) komplexszel

Az enzim-DNS komplexhez 2.5 µl 1 mM 1,10-fenantrolin/0.25 mM CuSO₄ és 2 µl 150 mM aszkorbinsav oldatot adtunk. A DNS hasítása és a minta további kezelése ugyanúgy történt, mint a hidroxilgyökös footprint esetében.

A DNS fragmentumok elektroforézise

A kicsapott DNS mintákat 2 μ l 98 % formamid, 10 mM EDTA pH 8,0, 0.025 % xilencianol és 0.025 % brómfenolkék oldatban oldottuk és 10%-os, 8M ureát tartalmazó poliakrilamid gélben futtattuk. A radioaktív csíkok láthatóvá tétele Molecular Dynamics 445 SI phosphorimage analyzer-rel történt. A gél Maxam-Gilbert A + G reakcióból származó fragmentumokkal kalibráltuk (Sambrook és mtsai., 1989).

Hivatkozások

- Ahmad, I. és Rao, D. N. 1994. Photolabeling of the *EcoP15* DNA methyltransferase with S-adenosyl-L-methionine. *Gene* 142: 67-71
- Bergerat, A. és Guschlbauer, W. 1990. The double role of methyl donor and allosteric effector of S-adenosyl-methionine for Dam methylase of *E. coli*. *Nucl. Acids Res.* 18: 4369-4375
- Biggin, M. D., Gibson, T. J. és 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
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Cheng, X., Kumar, S., Pósfai, J., Pflugrath, J. W. és Roberts, R. J. 1993. Crystal structure of the *HhaI* DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* 74: 299-307
- Dubey, A. K. és Roberts, R. J. 1992. Sequence-specific DNA binding by the *MspI* DNA methyltransferase. *Nucl. Acids Res.* 20: 3167-3173
- Fasman, G. D. ed. 1975. CRC handbook of biochemistry and molecular biology. 3rd edn., vol.1. CRC Press, Cleveland, Ohio.
- Finta, C., Sulima, U., Venetianer, P. és Kiss, A. 1995. Purification of the *KpnI* DNA methyltransferase and photolabeling of the enzyme with S-adenosyl-L-methionine. *Gene* 164: 65-69
- Hammond, A. W., Gerard, G. F. és Chatterjee, D. K. 1990. Cloning the *KpnI* restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Gene* 97: 97-102
- Henikoff, S. 1987. Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Meth. Enzymol.* 155: 156-165
- Janulaitis, A., Petrusyte, M., Maneliene, Z., Klimasauskas, S. és Butkus, V. 1992. Purification and properties of the *Eco57I* restriction endonuclease and methylase - prototypes of a new class (type IV). *Nucl. Acids Res.* 20: 6043-6049
- Kagan, R. M. és 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
- Kiss, A., Pósfai, G., Keller, C. C., Venetianer, P. és Roberts, R. J. 1985. Nucleotide sequence of the *BsuRI* restriction-modification system. *Nucl. Acids Res.* 13: 6403-6421
- Kiss, A., Finta, C. és Venetianer, P. 1991. *M.KpnI* is an adenine-methyltransferase. *Nucl Acids Res.* 19: 3460
- Klimasauskas, S., Timinskas, A., Menkevicius, S., Butkiene, D., Butkus, V. és 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. és Cheng, X. 1994. *HhaI* methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* 76: 357-369
- Kovács A. 1991. A *BspRI* modifikációs metiláz DNS-kötő sajátosságainak vizsgálata. Diplomamunka JATE, Szeged

- Kulakauskas, S., Lubys, A. és Ehrlich, S.D. 1995. DNA restriction-modification systems mediate plasmid maintenance. *J. Bacteriol.* 177: 3451-3454
- Labahn, J., Granzin, J., Schluckebier, G., Robinson, D. P., Jack, W. E., Schildkraut, I. és 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.
- Lauster, R. 1989. Evolution of 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 typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 119: 1072-1074
- Maxam, A. és Gilbert, W. 1980. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* 65: 499-560
- Naito, T., Kusano, K. és Kobayashi, I. 1995. Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* 267: 897-899
- Nelson, M. és McClelland, M. 1989. Effect of site-specific methylation on DNA modification methyltransferases and restriction endonucleases. *Nucl. Acids Res.* 17: r385-r415
- Papavassiliou, A. G. 1995. Chemical nucleases as probes for studying DNA-protein interactions. *Biochem. J.* 305: 345-357
- Pósfai, J., Bhagwat, A. S., Pósfai, G. és Roberts, R. J. 1989. Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucl. Acids Res.* 17: 2421-2435
- Price, C. és Bickle, T. A. 1986. A possible role for DNA restriction in bacterial evolution. *Microbiol. Sci.* 3: 296-299
- Reich, N. O. és Everett, E. A. 1990. Identification of peptides involved in S-adenosylmethionine binding in the *EcoRI* DNA methylase. *J. Biol. Chem.* 265: 8929-8934
- Reinisch, K. M., Chen, L., Verdine, G. L. és Lipscomb, W. N. 1995. The crystal structure of *HaeIII* methyltransferase covalently complexed to DNA: An extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* 82: 143-153
- Renbaum, P. és 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
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. és Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger, F., Nicklen, S. és Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Shine, J. és Dalgarno, L. 1975. Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254: 34-38
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. és Enquist, L. W. 1984. *Experiments with gene fusions.* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Som, S. és Friedman, S. 1990. Direct photolabeling of the *EcoRII* methyltransferase with S-adenosyl-L-methionine. *J. Biol. Chem.* 265: 4278-4283
- Szilák, L., Finta, C., Patthy, A., Venetianer, P. és Kiss, A. 1994. Self-methylation of *BspRI* DNA-methyltransferase. *Nucl. Acids Res.* 22: 2876-2881

- Tabor, S. és Richardson, C. C. 1985. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1074-1078
- Wenzel, C., Moulard, M., Lobner-Olesen, A. és Guschlbauer, W. 1991. Crosslinking of Dam methyltransferase with S-adenosyl-methionine. FEBS Lett. 280:147-151
- Wenzel, C. és Guschlbauer, W. 1993. Dam methyltransferase from *Escherichia coli*: sequence of a peptide segment involved in S-adenosyl-methionine binding. Nucl. Acids Res. 19: 4604-4609
- Wilson, G.G. 1991. Organization of restriction-modification systems. Nucl. Acids Res. 19: 2539-2566
- Wilson, G. G. és Murray, N. E. 1991. Restriction and modification systems. Ann. Rev. Genet. 25: 585-627
- Wu, J. C. és Santi, D. V. 1987. Kinetic and catalytic mechanism of *Hha*I methyltransferase. J. Biol. Chem. 262: 4778-4786
- Yuan, R. 1981. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. Annu. Rev. Biochem. 50: 285-315