

Egy DNS-metiltranszferáz specifitásának megváltoztatása tervezett enzimátalakítással és irányított enzimevolúcióval

Ph. D. értekezés

Albert Pál

Témavezető: Dr. Kiss Antal

Kutatás helye: Magyar Kutatási Hálózat
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet
DNS-Fehérje Kölcsönhatások Csoport

HUN-REN
Magyar Kutatási Hálózat



Képzés helye: Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola



Szeged

2024

Tartalomjegyzék

I. Rövidítések jegyzéke	4
II. Irodalmi áttekintés	5
II.1. A DNS metiláció biológiai jelentősége	5
II.2. A DNS metiláció szerepe prokariótákban	6
II.3. A DNS metiláció jelentősége magasabb rendű eukariótákban	7
II.4. Nem kanonikus citozin metiláció emlős genomokban	12
II.5. A C5-citozin metiltransferázok szerkezete és működése	13
II.5.1. A C5-citozin metiltransferázok katalitikus mechanizmusa	16
II.6. Kísérletek a DNS-metiltransferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatására	17
II.7. CG specifikus bakteriális C5-MTázok	19
III. Célkitűzés	22
IV. Anyagok és módszerek	24
IV.1. Enzimek és reakciókörülmények	24
IV.2. Oligonukleotidok	24
IV.3. Baktériumtörzsek	29
IV.4. Plazmidok	29
IV.5. Táptalajok, tenyésztési körülmények	31
IV.6. Plazmid DNS tisztítása	31
IV.7. Agaróz gélelektroforézis	31
IV.8. DNS fragmentumok izolálása gélből	32
IV.9. DNS koncentráció meghatározás	32
IV.10. Ligátum tisztítása elektroporáláshoz	32
IV.11. Plazmid DNS bejuttatása baktériumsejtekbe	32
IV.12. Helyspecifikus mutagenézis	33
IV.13. Error-prone PCR mutagenézis	35
IV.14. DNS szekvencia meghatározás	35
IV.15. A mutáns fehérjék túltermeltetése	36

IV.16. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis.....	36
IV.17. Fehérjetisztítás	36
IV.18. A metiltranszferáz változatok aktivitásának és specifikitásának jellemzése	37
IV.18.1. Plazmid védettségi teszt.....	37
IV.18.2. Trícium beépülésen alapuló MTáz aktivitásmérés	38
IV.19. Bioinformatikai módszerek.....	39
V. Eredmények.....	40
V.1. A vad típusú M.Mpel szekvenciaspecifikitása.....	40
V.2. Az M.Mpel általi specifikus DNS felismerésben szerepet játszó kölcsönhatások.....	43
V.3. Relaxált specifikitású M.Mpel változatok előállítása helyspecifikus mutagenézissel.....	44
V.3.1. F302 mutánsok.....	44
V.3.2. E305 mutánsok.....	46
V.3.3. Deléció az 1. felismerőhurokban.....	46
V.3.4. Mutációk a 2. felismerőhurokban	47
V.3.5. Deléciók a 2. felismerőhurokban.....	51
V.4. Megváltozott szekvenciaspecifikitású M.Mpel változatok előállítása véletlenszerű mutagenézissel	56
V.4.1. Helyspecifikus random mutagenézis.....	56
V.4.2. A 2. felismerőhurok két rövid szakaszának random mutagenizálása	60
V.4.3. „Error-prone” PCR mutagenézis.....	60
V.5. A M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) négyes mutáns tisztítása és jellemzése <i>in vitro</i> mérésekkel.....	66
V.5.1. A határoló nukleotidok hatása a CC metiláció hatékonyságára	68
VI. Az eredmények megvitatása	77
VII. Jövőbeli tervek	82
VIII. Köszönetnyilvánítás.....	83

IX. Hivatkozások jegyzéke	84
X. Saját publikációk jegyzéke	91
XI. Magyar és angol nyelvű összefoglaló	92
XI.1. Magyar nyelvű összefoglaló	92
XI.2. Angol nyelvű összefoglaló	94
XII. Témavezetői nyilatkozat	97

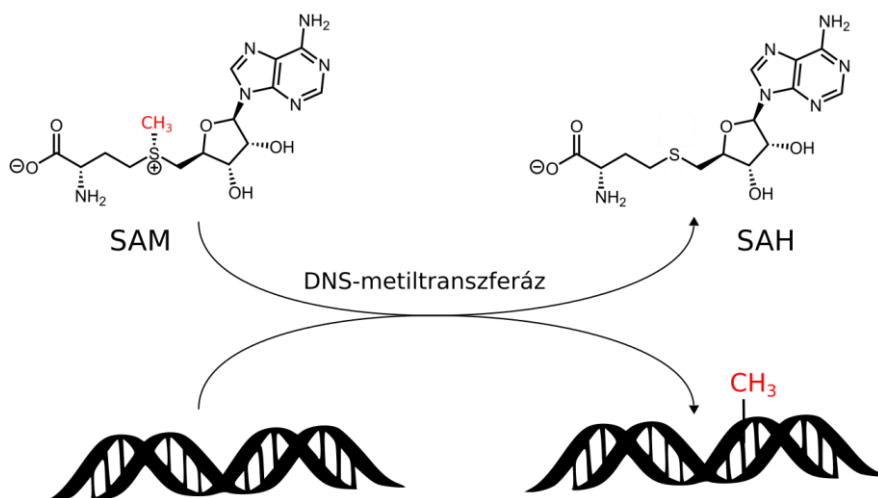
I. Rövidítések jegyzéke

Ap	ampicilin
ara	arabinóz
CcrM	Cell cycle regulated Methyltransferase
cpm	counts per minute
dCas9	'dead' Cas9
DME	DEMETER
dNTP	dezoxi-nukleozid-trifoszfát
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid
Kn	kanamicin
LB	Lysogeny Broth
MTáz	metiltranszferáz
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optikai denzitás
PCR	polimeráz láncreakció (polimerase chain reaction)
EP-PCR	'error-prone' polimeráz láncreakció
PDB	Protein Database
ROS1	REPRESSOR OF SILENCING 1
rpm	revolutions per minute
SAH	S-adenozil-L-homocisztein
SAM	S-adenozil-L-metionin
SDS	sodium-dodecyl-sulphate (nátrium-dodecil-szulfát)
SOB	super optimal broth
TALEN	transcription activator-like effector nucleases
TRD	target recognizing domain (targetfelismerő domén)
TB	terrific broth
UP	ultrapure

II. Irodalmi áttekintés

II.1. A DNS metiláció biológiai jelentősége

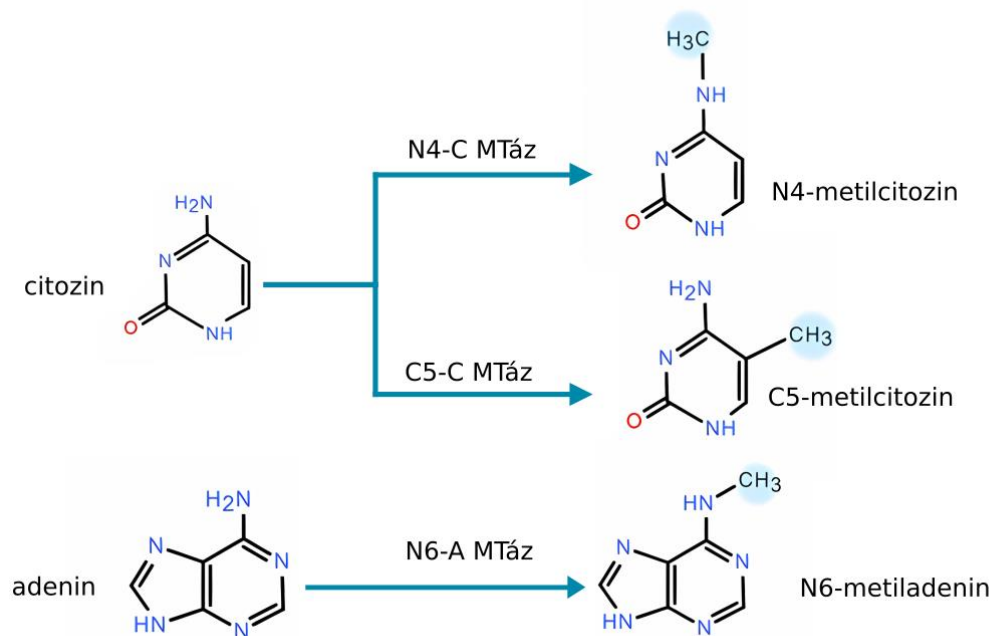
Már a múlt század közepén felfedezték, hogy élőlények DNS-ét felépítő nukleobázisok (adenin, guanin, timin és citozin) egy része módosított formában van jelen (Hotchkiss, 1948). Ezek biológiai jelentőségét azonban csak évtizedekkel később kezdték el felismerni. A DNS bázisok kovalens módosításai közül kiemelkedik a metiláció, amely mára a legintenzívebben tanulmányozott epigenetikai jellé vált. A metilcsoport a DNS-metiltranszferázoknak (DNS-MTáz) nevezett enzimek közreműködésével épül be - többnyire szekvenciaspecifikus módon - a DNS adenin és citozin bázisaiba. Jelenlegi ismereteink szerint valamennyi DNS-MTáz S-adenozil-L-metionint (SAM) használ metildonornak, melyből az aktivált metilcsoport átadását követően S-adenozil-L-homocisztein (SAH) keletkezik (1. ábra).



1. ábra: A DNS-metiláció általános folyamata. SAM: S-adenozil-L-metionin, SAH: S-adenozil-L-homocisztein.

A DNS-MTázokat a reakció termékeként keletkező metilált bázis alapján három csoportba sorolják: C5-citozin, N4-citozin, valamint N6-adenin MTázokat különböztetünk meg. Az N4-citozin, és N6-adenin MTázok a citozin, illetve adenin exociklus aminosocsoportját metilálják, melynek eredményeként N4-metilcitozin, illetve N6-

metiladenin keletkezik. A C5-citozin MTázok a citozin gyűrű 5-ös szénatomjára helyezik el a metilcsoportot és ezáltal C5-metilcitozin jön létre (2. ábra).



2. ábra: A DNS MTázok típusai és a metiláció eredményeként keletkező metilált bázisok (Q. Gao és mtsai., 2023) alapján.

A metilcsoport mindhárom metilált bázis esetében a DNS nagy árkában helyezkedik el és nem befolyásolja a Wattson-Crick-féle bázispárok kialakulását, ugyanakkor hatással lehet a genomban tárolt információ kifejeződésére azáltal, hogy bizonyos DNS kötő fehérjék (például transzkripció faktorok, hiszton módosító enzimek) képesek ezen módosított bázisokat felismerni (Du és mtsai., 2015).

II.2. A DNS metiláció szerepe prokariótákban

Prokariótákban mindhárom DNS-metiltranszferáz enzimsalád megtalálható és az enzimek többsége a restrickciós-modifikációs (RM) rendszerek részeként működik, melyek egyfajta bakteriális immunrendszernek tekinthetők. Az eddig leírt négyféle RM rendszer közül - valószínűleg a kiemelkedő géntechnológiai jelentősége miatt - a II-es típusú áll rendelkezésre a legtöbb ismeret (Pingoud és mtsai., 2014). A II-es típusú RM-rendszerek két különálló enzimből, egy restrickciós endonukleázból és egy DNS-

metiltranszferázból állnak, melyek azonos (általában 4-8 bázispár hosszúságú) DNS szekvenciát ismernek fel. A restriktációs enzim feldarabolja a sejtbe bejutott idegen (metilálatlan) DNS-molekulákat, s ezáltal védelmet nyújt a sejtet megfertőző bakteriofágokkal szemben. A DNS-metiltranszferáz a sejt saját DNS-ében található endonukleáz felismerőhelyeket metilációval megjelöli, így azok, mivel a metilált felismerőhelyek nem szubsztátjai a restriktációs enzimnek, elkerülik az emésztést.

Leírtak olyan bakteriális DNS-MTázokat is, melyek nem részei RM-rendszernek. Ezeket a megfelelő specifikitású endonukleáz párral nem rendelkező enzimeket „árva” („orphan”), vagy „magányos” („solitary”) metiltranszferázoknak nevezik. A legismertebb ilyen MTáz az *E. coli*-ban leírt Dam (DNA adenine methylase), amely a 5'-GATC-3' szekvenciát ismeri fel és az abban található adenin N6-nitrogénjét metilálja a DNS mindkét szálán (Hattman és mtsai., 1978). A Dam metilációnak fontos szerepe van a DNS-replikáció során keletkező bázispárosodási hibák javításában (postreplicative mismatch repair), valamint a kromoszomális genom replikációjának szabályozásában (Adhikari & Curtis, 2016). Egy hasonló rendszer működik a *Caulobacter crescentus* baktériumban is, amely a 5'-GANTC-3' szekvenciákat metiláló (az adenin metilálódik) CcrM (cell cycle-regulated DNA methyltransferase) enzimen alapul (Berdis és mtsai., 1998).

II.3. A DNS metiláció jelentősége magasabb rendű eukariótákban

Jelenlegi ismereteink szerint a magasabb rendű eukarióták DNS-ében a három metilált bázis közül csak az egyik, a C5-metilcitozin található meg (Douvlatianotis és mtsai., 2020). A C5-metilcitozin növényekben CG, CHG, és CHH (H = adenin, vagy citozin, vagy timin) szekvenciakörnyezetben fordul elő (Lucibelli és mtsai., 2022). Több rovarcsoportban (többek között a méhek és hangyák (Bonasio és mtsai., 2012; Lyko és mtsai., 2010) esetében is megtalálható a citozin metiláció, ugyanakkor az egyik leggyakrabban használt modellorganizmus, az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) esetében ez a DNS módosítás nem mutatható ki (Lyko és mtsai., 2010; Urieli-Shoval és mtsai., 1982).

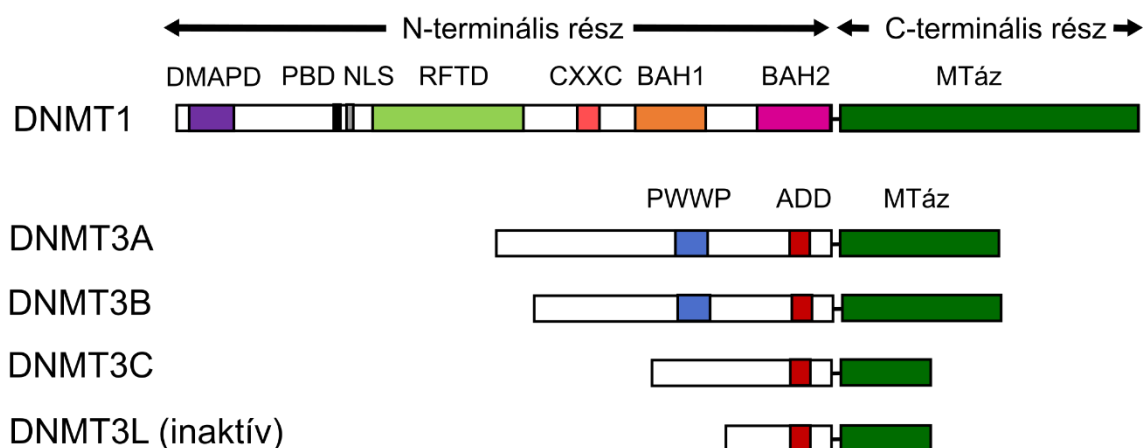
Emlős genomokban a C5-metilcitozin elsősorban a 5'-CG-3' dinukleotidokban fordul elő, melyeket CpG helyeknek is neveznek. A CG dinukleotidok szimmetrikus szekvenciák, melynek következtében az egyes CG helyek metilációs állapota háromféle

lehet: metilálatlan (5'-CG-3'/5'-CG-3'), hemimetilált (5'-^{m5}CG-3'/5'-CG-3'), vagy teljesen metilált(5'-^{m5}CG-3'/5'-^{m5}CG-3').

Becslések szerint az emlős szomatikus sejtekben a CG dinukleotidok mintegy 70%-a metilált formában van jelen (Jabbari & Bernardi, 2004). A genomban a metilált és metilálatlan CG helyek eloszlása nem véletlenszerű és az adott sejtípusra jellemző mintázatot alkotnak (Z. Chen & Riggs, 2011). Érdekes megfigyelés, hogy az emlős genomokban a CG dinukleotidok valós előfordulási gyakorisága szignifikánsan alacsonyabb a statisztikai számítások alapján várt értéknél (Jabbari & Bernardi, 2004; Shen és mtsai., 1992). A jelenség hátterében feltehetően az áll, hogy a metilált CG helyek mutációs „forrópontok” (mutation hot spot), mivel a metiláció termékeként keletkező C5-metilcitozin hajlamos a spontán hidrolitikus dezaminációra, ami C→T tranzíciókhoz vezethet. A mutációk következtében a CG helyek egy része elveszett az évmilliók során.

Annak ellenére, hogy az emlős genomokban a CG dinukleotidok összességében alulreprezentáltak, léteznek olyan genomi régiók ahol a CG helyek gyakorisága kiugróan magas. Ezen, általában néhány száz bázispár hosszúságú, DNS szakaszokat CpG szigeteknek nevezik (Bird és mtsai., 1985). A CpG szigetek gyakran átfednek a gének promotereivel, például a humán genomban található promoterek mintegy 70 %-a CpG dinukleotidokban gazdag (Saxonov és mtsai., 2006). A CpG szigetek nagyobb gyakorisággal fordulnak elő a „háztartási gének” promotereiben, mint a szövetspecifikus génekében(Larsen és mtsai., 1992; Ponger és mtsai., 2001). Jelenleg nem ismert pontosan az oka annak, hogy a CpG szigetek miért nem vesztek el a dezamináció következtében. Feltehetőleg, az érintett promóterek metiláció általi szabályozhatóságának megtartása olyan fontos volt, hogy elegendő szelekciós nyomást tudott biztosítani CpG helyek fennmaradásához (Saxonov és mtsai., 2006).

Az emlősök esetében a genomi CG metilációs mintázat kialakításáért és fenntartásáért a Dnmt családba tartozó C5-MTázok felelősek. Az enzimes családnak jelenleg öt tagja ismert (Jurkowska és Jeltsch, 2016).



3. ábra: Az emlős DNS-MTázok doménszerkezete (Jeltsch & Jurkowska, 2016) alapján. DMAPD: DNA methyltransferase associated protein 1 interacting domain, PBD: PCNA binding domain, NLS: Nuclear localization signal, RFTD: Replication foci targeting domain, CXXC: CXXC domain, BAH1 és BAH2 – bromo-adjacent homology domains 1 and 2, GKn – glycine lysine repeats, PWWP: PWWP domain, ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L domain.

Össességében, a Dnmt enzimek két funkcionálisan eltérő részből épülnek fel (3. ábra). A C-terminális doménben azonosíthatók a bakteriális C5-MTázokra is jellemző konzervált szekvenciamotívumok. Ez a domén értelemszerűen a fehérje katalitikus funkciójáért felel. Az enzimek N-terminális része szabályozó doménként működik azáltal, hogy felületet biztosít más fehérjékkel (pl. hisztonok) való kölcsönhatásokhoz, melyek serkenthetik, gátolhatják, illetve a genom valamely részéhez irányíthatják az enzimet (Gowher & Jeltsch, 2018; Jeltsch & Jurkowska, 2016).

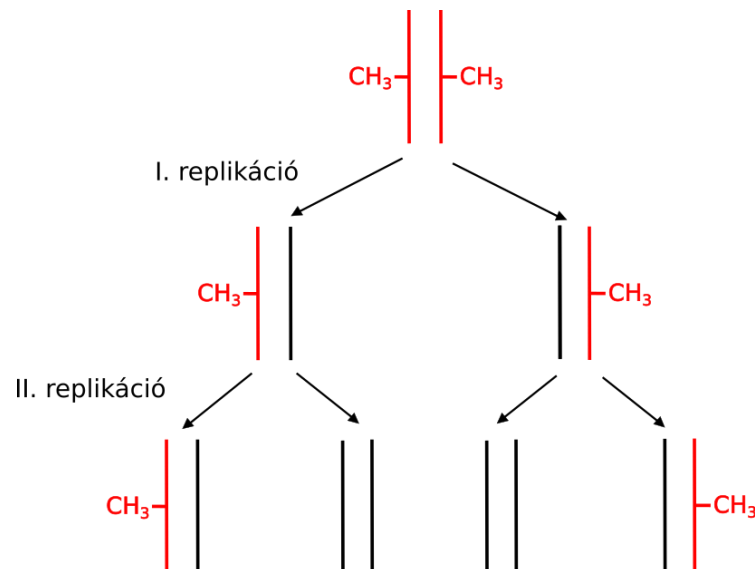
A szövetspecifikus metilációs mintázat kialakításáért a Dnmt3a és a Dnmt3b metiltranszferázok („*de novo*” metiltranszferázok) felelnek. Ezen enzimeknek a metilálatlan és hemimetilált CG helyek egyaránt szubsztrátjai.

A Dnmt1 enzimet „fenntartó” („maintenance”) metiltranszferáznak is nevezik, mivel elsődleges feladata a DNS replikációt követően keletkező hemimetilált CG helyek módosítása, mely során teljesen metilált CG dinukleotidok jönnek létre (Hermann és mtsai., 2004). Ez a mechanizmus felelős azért, hogy a szövetre jellemző metilációs mintázat fennmaradjon a sejtosztódásokat követően is.

A Dnmt3c enzimet a közelmúltban fedezték fel egérben és feltehetőleg a Dnmt3b enzimet kódoló gén duplikációjával jöhetett létre. Az MTáz a hímivarsejtekben fejeződik ki és feladata a genom integritásának védelme a transzpozonok metilálása által (Barau és mtsai., 2016).

Az enzimcsalád ötödik tagja, a Dnmt3L (Dnmt3-like) különleges abból a szempontból, hogy önmagában nem rendelkezik metiltranszferáz aktivitással. Ennek ellenére képes befolyásolni a metilációt azáltal, hogy kölcsönhatásba lép a *de novo* metiltranszferázok N-terminális részével és serkenti azok működését (Suetake és mtsai., 2004). Kimutatták továbbá, hogy Dnmt3L jelenléte egerekben nélkülözhetetlen az imprintált gének csendesítéséhez (Bourc'his és mtsai., 2001). A Dnmt1 és Dnmt3a/b enzimek fontosságát jól mutatja, hogy hiányuk egerekben embrionális korban vagy röviddel a születés után halált okoz (Li és mtsai., 1992; Okano és mtsai., 1999).

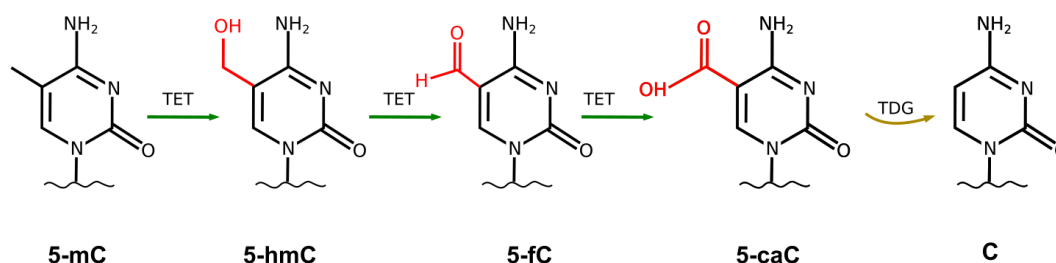
A DNS metiláció, akár csak a többi epigenetikai jel, reverzibilis módosítás. A demetiláció történhet passzívan, mely során fenntartó metiltranszferáz aktivitás hiányában a metiláció „kihígul” a DNS replikáció és az azt követő sejtosztódások következtében (4. ábra).



4. ábra: A passzív demetiláció mechanizmusa.

Régóta feltételezik, hogy létezhetnek aktív demetilációs mechanizmusok is, mivel bizonyos sejtek esetében rövid idő alatt olyan mértékű metilációs mintázat átrendeződést tapasztaltak, ami nem magyarázható a passzív demetilációval (Mayer és mtsai., 2000). A legnyilvánvalóbb aktív demetilációs mechanizmus - a metilcsoport közvetlen enzimatis lehasítása a citozinról - termodinamikailag nehézségekbe ütközik a rendkívül stabil szén-szén kötés miatt, így nem meglepő hogy a jelenleg ismert demetilációs rendszerek úgy működnek, hogy az egész metilált bázist (a glikozidos kötés

felbontásával) eltávolítják a DNS-ből. Zárwatermő növények esetében ez közvetlenül történik a DME/ROS1 glikozilázok közreműködésével (H. Jang és mtsai., 2014). Emlősejtekben a módosított citozin kivágását többlépéses enzimatis oxidáció előzi meg: (5-metil-citozin (5^mC) $\rightarrow$ 5-hidroxi-metil-citozin ($5^{hm}C$) $\rightarrow$ 5-formil-citozin (5^fC) $\rightarrow$ 5-karboxi-citozin ($5^{ca}C$)), melyet a TET (Ten-eleven Translocation) fehérjék katalizálnak (Tahiliani és mtsai., 2009) (5. ábra). A keletkező léziót (abázikus helyek) az emlősejtek és növények esetében is a báziskivágásos hibajavítás (base excision repair) állítja helyre, melynek eredményeként metilálatlan citozin épül be. Érdekes megjegyezni, hogy a TET által katalizált oxidáció során keletkező $5^{hm}C$ nem csak egy köztitermék az aktív demetilációs folyamatban, hanem epigenetikai jelként is működik (Mellen és mtsai., 2012).



5. ábra: A TET által katalizált aktív demetiláció folyamata (Tahiliani és mtsai., 2009) alapján.

A citozin metilációt általában gátló hatású epigenetikai jelnek tekintik. Valóban számos bizonyíték van arra, hogy promoterben található CG helyek metiláltsága negatív korrelációt mutat az adott gén kifejeződésével (Boyes és Bird, 1992; Lister és mtsai., 2009; Weber és mtsai., 2007). A képet ugyanakkor némileg árnyalja, hogy egyes tanulmányok szerint a génen belül található CG helyek metilációja a fentivel ellentétes hatású, azaz a génexpressziót fokozza (Yang és mtsai., 2014).

A genomi metilációs mintázata dinamikusan változik az egyedfejlődés során. A petesejt megtermékenyítését követően kiterjedt aktív demetiláció megy végbe a genomban, melynek következtében az ivarsejtekre jellemző metiláció nagyrészt eltűnik. Az embrió beágyazódása után a „*de novo*” metiltranszferázok közreműködésével új metilációs mintázatok alakulnak ki sejtvonal specifikus módon (Borgel és mtsai., 2010; Smith és mtsai., 2012; Xu & Xie, 2018). Ez a differenciált metiláció más epigenetikai mechanizmusokkal (pl. hiszton módosítások) együttműködve teszi lehetővé az egyes sejttípusokra jellemző génexpressziós mintázatok kialakulását.

A metilációnak a szövetspecifikus génexpressziós mintázat fenntartása mellett szerepe van még az X-kromoszóma inaktivációban valamint, a genomi imprintingben. A metiláció nélkülözhetetlen továbbá az emlős genom jelentős részét kitevő transzpozonok és endogén retrovírusok működésének gátlásához, mely elengedhetetlen a genom stabilitásának megőrzéséhez (Yoder és mtsai., 1997).

Az abnormális DNS metiláció számos betegség esetében fontos szerepet játszik a patológiás folyamatokban (Robertson, 2005). A rákos sejtek genomjára általánosan jellemző a globális genomi metilációs szint csökkenése, melynek következménye a proto-onkogének, illetve a mobilis genetikai elemek aktiválódása (Ehrlich, 2009). Ez utóbbi magyarázatul szolgálhat a tumorok esetében tapasztalt genomi instabilitásra. A globális hipometiláció mellett előfordul, hogy bizonyos tumor szupresszor gének (például p15) promoterei hipermetilálódnak, gátolva azok kifejeződését (Nakaoka és mtsai., 2017).

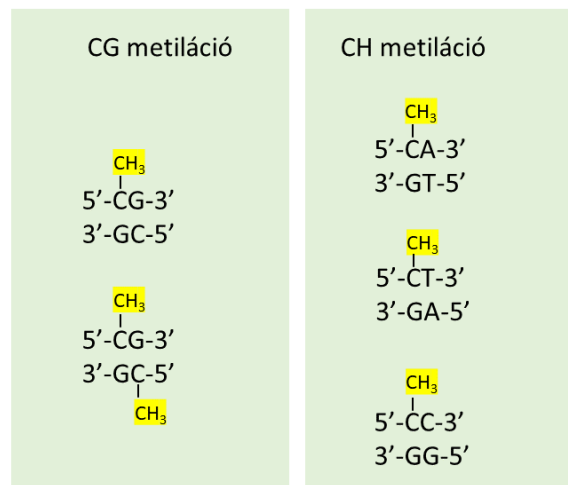
II.4. Nem kanonikus citozin metiláció emlős genomokban

Az elmúlt évtizedekben számos emlős szövet- és sejtípus esetében végeztek teljes genomi biszulfid szekvenálást (whole genome bisulphite sequencing, vagy WGBS) melyek során felfedezték, hogy bizonyos szövetekben a C5-metilcitozinok egy része nem a kanonikus CG dinukleotidokban található (He & Ecker, 2015; Patil és mtsai., 2014; Ziller és mtsai., 2011). A metiláció ezen formáját nem-CG metilációnak (non-CG methylation) nevezték el. A nem-CG metiláció a CA, CT és CC szekvenciakörnyezetben található citozinokat érinti, ezért gyakran CH (H = A, T vagy C) metilációként is hivatkoznak rá.

Biokémiai és genetikai vizsgálatokkal bizonyították, hogy a CH metilációért a *de novo* MTáz Dnmt3a és Dnmt3b enzimek felelősek, melyek a CG dinukleotidok mellett - kisebb hatékonysággal – a CA, CT és CC helyeket is képesek metilálni (Aoki és mtsai., 2001; Barrès és mtsai., 2009; L. Gao és mtsai., 2020; Ramsahoye és mtsai., 2000; Zhang és mtsai., 2018). A nem-kanonikus citozin metiláció valamennyi eddig jellemzett szövettípus esetében leggyakrabban a CA szekvenciákban fordul elő. A CT és CC helyek metilációja kevésbé jelentős.

A nem-CG metilációnak van egy fontos tulajdonsága, mely megkülönbözteti a CG metilációtól: a CH helyek aszimmetrikusak (5'-CA-3'/5'-TG-3', 5'-CT-3'/5'-AG-3', 5'-CC-3'/5'-GG-3'), tehát a felismerőhely csak a DNS egyik szálán metilálódhat, mivel a komplementer szekvenciában nincs citozin (6. ábra). Ez a tény kizárja annak a

lehetőségét, hogy sejtosztódás során a CH metilációs mintázat egy fenntartó MTáz által átöröklődjön az utódsejtekre.



6. ábra: A CG és nem-CG metiláció összehasonlítása.

A CH metiláció előfordulási gyakorisága sejt- illetve szövettípusonként jelentős változatosságot mutat. Az emberi szervezetben a nem-kanonikus metiláció az agy homloklebenyi régiójában található neuronokban fordul elő a legnagyobb mennyiségben, elsősorban a 5'-CAC-3' szekvenciákon belül (az aláhúzott citozin metilálódik) (Guo és mtsai., 2014; H. S. Jang és mtsai., 2017; Kinde és mtsai., 2015). A CH metiláció szempontjából jelentősnek tekinthetők még az embrionális őssejtek, ahol a CA helyek elsősorban a 5'-CAG-3' szekvenciakörnyezetben metiláltak (Lee és mtsai., 2017; Ramsahoye és mtsai., 2000). A nem-kanonikus metiláció kimutatható még többek között indukált pluripotens őssejtekben (iPSC), petesejtekben, vázizomsejtekben, adipocitákban is (He & Ecker, 2015).

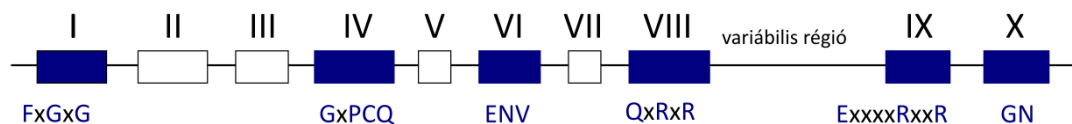
A CG metilációval ellentétben a CH metiláció biológiai szerepéről, a szövetspecifikus CH metilációs mintázat kialakulásának mechanizmusáról jelenleg nagyon kevés ismerettel rendelkezünk és az eredmények gyakran ellentmondásosak. További kutatások szükségesek a CH metiláció jelentőségének tisztázásához.

II.5. A C5-citozin metiltranszferázok szerkezete és működése

A C5-citozin metiltranszferázok (EC 2.1.1.37) a prokariótákban és eukariótákban is megtalálhatók. Ezen enzimek többnyire monomer fehérjék, azaz egyetlen polipeptid

láncból épülnek fel, melynek hossza a bakteriális MTázok esetében általában 300-400 aminosav. Az eukarióta C5-MTázok nagyobbak, mivel a metiltranszferáz domén mellett tartalmaznak egy N-terminális szabályozó domént is (3. ábra).

A C5-MTáz aminosav szekvenciák összehasonlításával tíz konzervált szekvenciamotívumot azonosítottak, amelyek valamennyi enzimben megtalálhatók, legyenek azok bakteriális vagy eukarióta eredetűek (Kumar és mtsai., 1994; Pósfai és mtsai., 1989). A konzervált blokkokat – melyek a legtöbb enzim esetében a megadott sorrendben fordulnak elő - római számokkal jelöljük I-től X-ig (7. ábra). Az I, IV, VI, VIII, IX, X motívumok erősen, míg a II, III, V, VII motívumok gyengébben konzerváltak. A VIII-as és IX-es konzervált blokkok által közrefogott szakasz az úgynevezett variábilis régió, melynek aminosav szekvenciája és mérete jelentős változatosságot mutat az egyes enzimek között. A konzervált motívumokban található aminosavaknak a metildonor S-adenozil-L-metionin kötésében és a metilcsoport-átvitel katalízisében van szerepük. A variábilis régió tartalmazza a targetfelismerő domént (TRD: **t**arget **r**ecognising **d**omain), mely az enzim szekvenciaspecifitásáért felel (Balganesh és mtsai., 1987; Klimašauskas és mtsai., 1991).

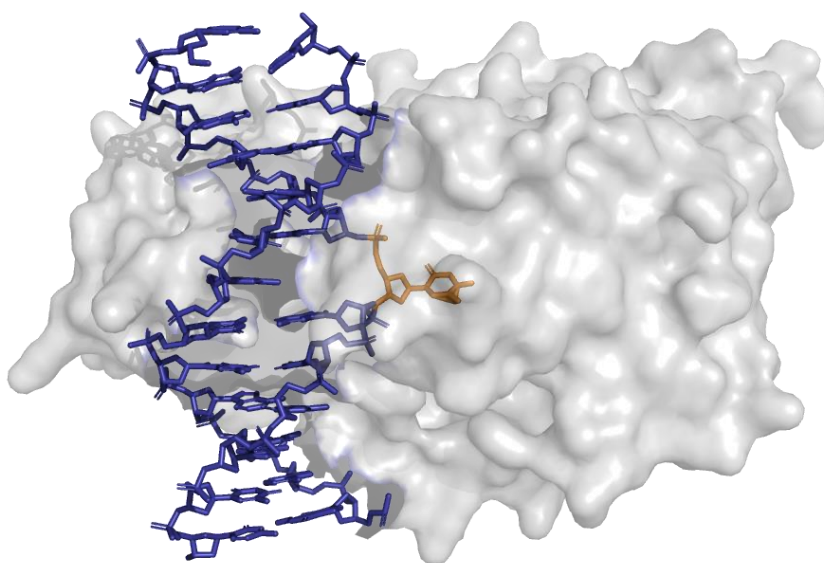


7. ábra: A C5-citozin MTázok konzervált motívumai. Az erősen konzervált motívumokat kék, a gyengén konzervált motívumokat fehér téglalapok jelölik. Alul láthatók az adott motívumra jellemző konszenzus szekvenciák.

A C5-MTázok többsége monospecifikus metiltranszferáz, azaz csak egyféle metilációs célhelyet ismer fel. A monospecifikus MTázok körébe tartoznak többek között a restriktációs-modifikációs rendszerek részét képező MTázok, valamint olyan árva MTázok, mint például a Dam vagy CcrM. A monospecifikus MTázok esetében a szekvenciaspecifitásért felelős variábilis régió általában 80 -120 aminosavból épül fel.

A C5-metiltranszferázok háromdimenziós szerkezetére vonatkozó ismereteink elsősorban a kristályosított fehérjék röntgendiffrakciós vizsgálatából származnak. Elsőként a *Haemophilus haemolyticus* baktériumból izolált HhaI metiltranszferáz (M.HhaI) S-adenozil-L-metioninnal alkotott komplexének szerkezetét közölték (Cheng és

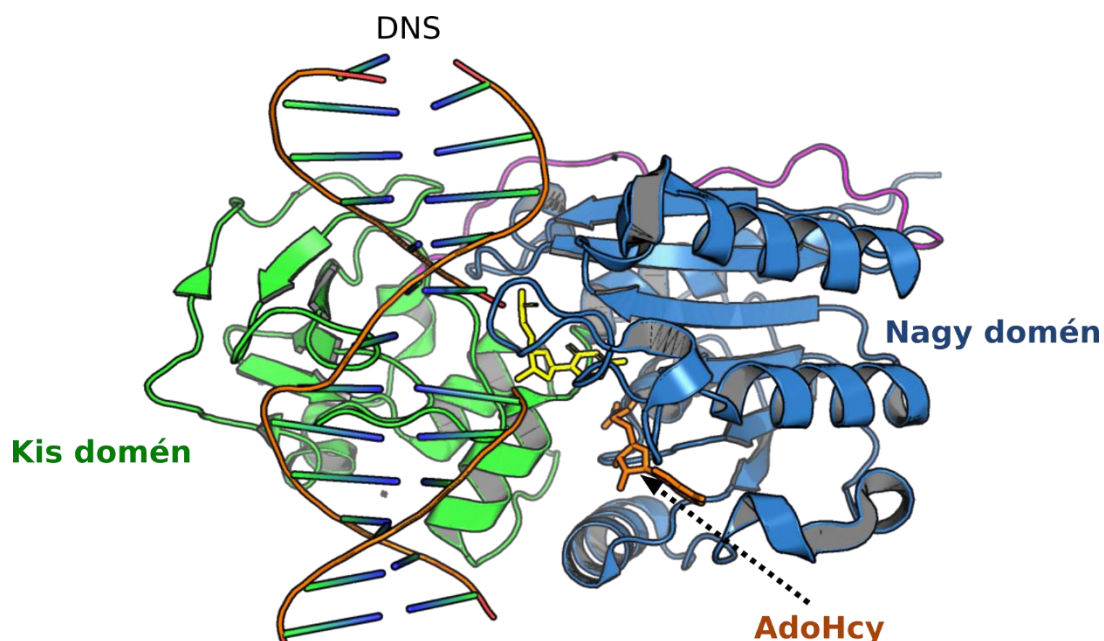
mtsai., 1993). Hamarosan az M.HhaI DNS-el alkotott specifikus felismerőkomplexének szerkezetét is meghatározták, mely során felfedezték, hogy az enzim a metilálendő citozint teljesen kifordítja a DNS-ből (Klimasauskas és mtsai., 1994) (8. ábra). Ma már tudjuk, hogy a báziskifordítás („base flipping”) jelensége valamennyi DNS MTázra jellemző és nélkülözhetetlen a MTáz reakcióhoz, mivel a kettős hélixben eltemetett bázis nem hozzáférhető a katalitikus apparátus számára.



8. ábra: A specifikus M.HhaI-DNS felismerőkomplex röntgenkristallográfiás szerkezete (PDB: 2HR1). Az enzim kifordítja a metilálendő bázist (narancs szín) a duplaszálú DNS-ből (kék).

Az eddig publikált C5-MTáz szerkezeteket összevetve (<http://rebase.neb.com/cgi-bin/crylist>) elmondható, hogy az enzimek egy kis és egy nagy doménből állnak, melyeket egy, a DNS kötésre szolgáló árok választ el egymástól (9. ábra). A nagy domén a DNS kis árkával a kis domén a DNS nagy árkával lép kölcsönhatásba. A nagy domén magját egy β -redős szerkezet alkotja, amely 6 párhuzamos lefutású β -szálból épül fel, melybe beékelődik egy hetedik antiparallel szál az ötödik és hatodik szálak közé. A nagy domén magába foglalja az I-VIII motívumokat és a X-es motívumot, a kis domén pedig a IX-es motívumot és a variábilis régiót tartalmazza. A konzervált motívumok többnyire a másodlagos szerkezeti elemeket összekötő hurkokban helyezkednek el. Az I-es, II-es, III-as, X-es motívumok együttesen alakítják ki a SAM kötő zsebet, míg a katalitikus zseb

felépítésében az V-ös, VI-os, VII-es, VIII-as motívumok vesznek részt. A kis doménben található a TRD (target recognising domain), amely egy vagy több hurokból épül fel és szekvenciaspecifikus kölcsönhatásokat létesít a felismerőhely bázisaival a DNS nagy árki felszínén.

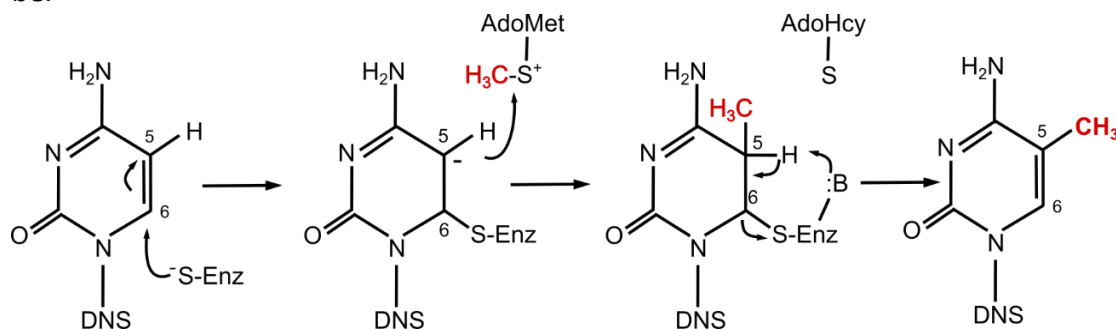


9. ábra: Az *M.HhaI*-DNS-AdoHcy terner komplex szerkezeti modellje (PDB: 2HR1).

II.5.1. A C5-citozin metiltranszferázok katalitikus mechanizmusa

A metiltranszferáz először nonspecifikus módon kötődik a DNS-hez, főleg a cukor-foszfát gerinccel kialakított kölcsönhatásokon keresztül, majd lineáris diffúzióval mozog a DNS lánc mentén, addig amíg egy felismerőhelyet nem talál, amikor is megtörténik a szekvenciaspecifikus DNS kötés, mely a fehérje konformációjának jelentős megváltozásával jár (Poddar és mtsai., 2018). A következő lépésben az enzim kifordítja a metilálendő citozint a DNS-ből. A kibillentett bázis helyét egy aminosav oldallánc (az *M.HhaI* esetében a Glu-237) foglalja el, mely hidrogénhíd-kötést létesít az árván maradt guaninnal („orphan guanine”), stabilizálva ezt az energetikailag kedvezőtlen DNS konformációt. A kifordított citozin a nagy doménben található hidrofób katalitikus zsebbe illeszkedik.

A C5-MTázok által katalizált reakció lépéseit (Wu & Santi, 1987) a 10. ábra mutatja be.



10. ábra: A C5-MTázok által katalizált DNS-metiláció lépései (Darii és mtsai., 2009).

A IV. motívumban (PCQ) található ciszteinből képződő tiolát anion nukleofil támadást indít a citozin 6. szénatomja ellen, melynek eredményeként kovalens kötés alakul ki az enzim és a DNS szubsztrát között. A kovalens komplex kialakulását a citozin gyűrűben elhelyezkedő N3 atom protonálódása is segíti, mely a VI. motívumban (ENV) található glutaminsav közreműködésével megy végbe. A fenti lépések eredményeként a C5 atom aktiválódik, így átkerülhet rá a metilkation a SAM-ról, melyből a reakció során S-adenosyl-L-homocisztein (SAH) keletkezik. A metiltranszfert követően a C5-atom deprotonálódik, majd a kovalens kötés a katalitikus cisztein és a C6-atom között β -eliminációval megszűnik. Végül a metilcitozin visszafordul a DNS-duplexbe, és SAH disszociál az enzimről.

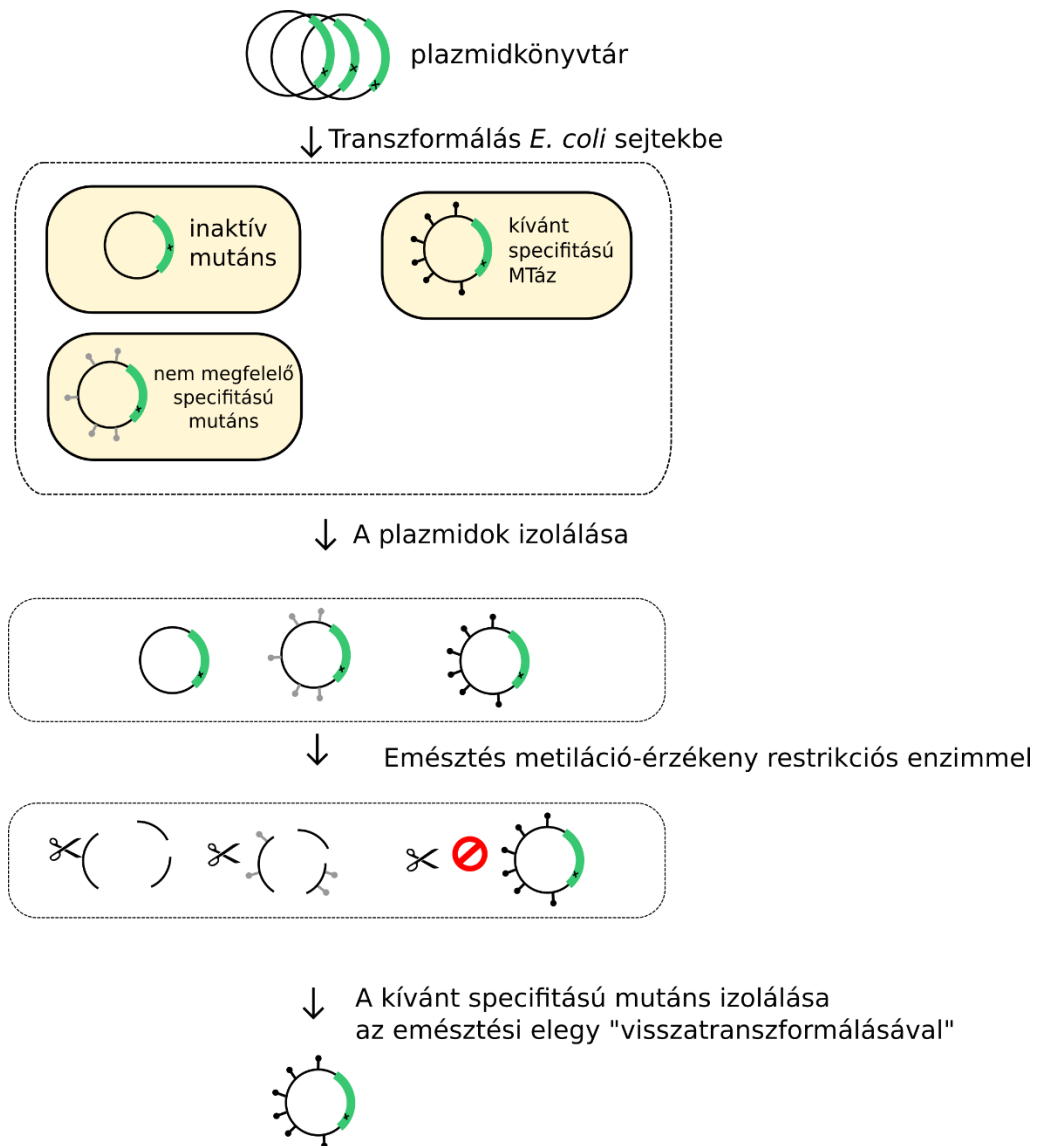
II.6. Kísérletek a DNS-metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatására

Az elmúlt évtizedekben számos kutatócsoport próbálkozott, a fehérjemérnökség eszköztárát felhasználva, különböző bakteriális DNS-metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatásával. Az ilyen irányú kutatások mögött többféle motiváció is állt, mint például a specifikus DNS-fehérje kölcsönhatások mélyebb megismerésére való törekvés, vagy az új szekvenciaspecifitások kialakulásához vezető evolúciós útvonalak feltérképezése. A molekuláris biológiai kutatásokhoz is hasznosak lehetnek az új szekvenciaspecifitással rendelkező enzimek.

A DNS-metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatása nem egyszerű feladat, az irodalomból kevés sikeres próbálkozás ismert (Chahar és mtsai.,

2010; Gerasimaitė és mtsai., 2009; Kiss és mtsai., 2001; Rockah-Shmuel & Tawfik, 2012; Tímár és mtsai., 2004). Más DNS kötő fehérjékkel (mint például a cink-ujj fehérjék, TALEN) ellentétben a DNS-MTázok esetében nincsenek jól definiálható DNS-felismerő motívumok, amelyek tervezhetővé tennék a szekvenciaspecifitást. A különböző MTázok változatos módon ismerik fel a metilációs célhelyet, gyakran indirekt kölcsönhatásokon keresztül, melyek nem vagy nehezen olvashatók ki az enzim-DNS specifikus komplexének röntgenkristallográfiás szerkezetéből (ami sok esetben nem is áll rendelkezésre). A bázisspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatások tervezett megváltoztatása általában nem vezetett eredményre (a legtöbb esetben relaxált specifitású enzimeket eredményezett) így a kutatók az irányított evolúciós megközelítés felé fordultak. Az irányított evolúciós kísérletek során nagyszámú mutáns változatot hoznak létre a fehérjét kódoló génből valamilyen *in vivo* (pl. mutátor törzsek használata) vagy *in vitro* technika (pl. error prone PCR, helyspecifikus telítési mutagenézis) alkalmazásával, majd egy gondosan megtervezett szelekciós rendszer segítségével kiválogatják azon génváltozatokat, melyek a kívánt fenotípusú fehérjét kódolják. Az irányított enzimevolúciót elsőként Frances Arnold alkalmazta olyan szubsztilizin E változatok előállítására, melyek szerves oldószert (dimetilformamid) tartalmazó közegben is működőképesek maradtak (K. Chen & Arnold, 1993).

A DNS-metiltranszferázok kiváló alanyai az irányított evolúciós kísérleteknek, mivel a MTáz kódoló DNS maga is az enzim szubsztrátját képezi, s ebből egy rendkívül egyszerű és elegáns szelekciós módszer adódik: a nem kívánt specifitású/aktivitású változatokat kódoló DNS konstrukciók megfelelően kiválasztott metiláció érzékeny restriktációs enzimek segítségével eliminálhatóak. Egy ilyen irányított evolúciós kísérlet általános lépéseit mutatja be a 11. ábra. A mutáns plazmidkönyvtárat *E. coli* sejtekbe transzformálják. A sejtekben kifejeződő MTáz változatok, feltéve ha aktívak, metilálják a saját kódoló plazmidjukat, melyek így hordozni fogják az adott mutánsra jellemző metilációs mintázatot. A sejtekből izolált plazmidokat a kívánt specifitású metilációraérzékeny restriktációs enzimekkel emésztik. Az emésztési elegy visszatranszformálásával feldúsíthatóak azok a plazmidok, melyek a kívánt specifitású mutánst kódolják. (Ezt a plazmidvédeltségen alapuló technikát eredileg restriktációs-modifikációs rendszerek klónozására használták (Kiss és mtsai., 1985; Szomolányi és mtsai., 1980)).



11. ábra: Az *in-vivo* plazmidmetiláción alapuló szelekciós stratégia folyamatábrája.

II.7. CG specifikus bakteriális C5-MTázok

Az „árva” (restrikciós endonukleáz párral nem rendelkező) bakteriális C5-metiltranszferázok közül kiemelt jelentőségű az M.SssI és az M.MpeI, mivel szekvenciaspecifitásuk megegyezik az emlős Dnmt enzimekével: a CG dinukleotidokban található citozinokat metilálják. Ennek következtében ezen enzimek kiváló kutatási eszközök lehetnek az emlősökre jellemző DNS metiláció tanulmányozásához.

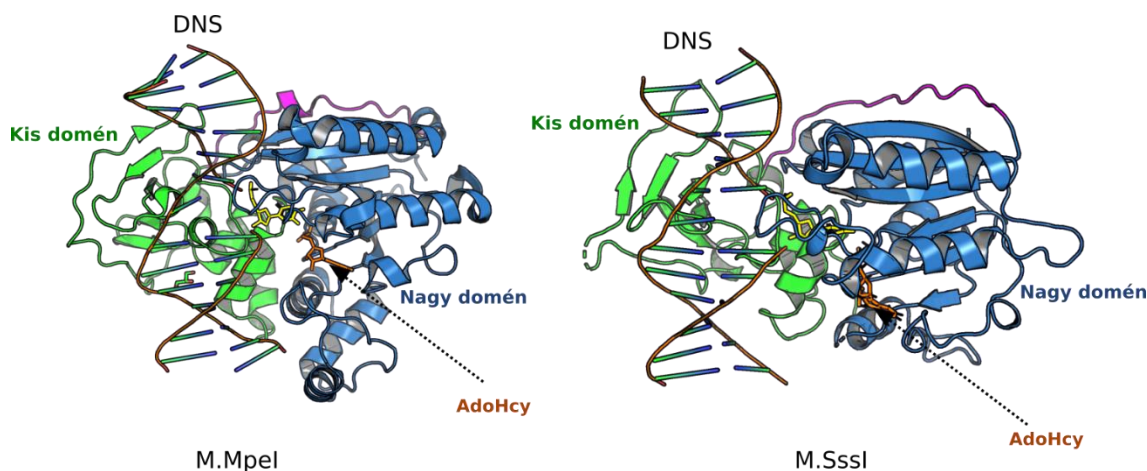
Az 1990-ben leírt M.SssI a *Spiroplasma monobiae* MQ1 törzsből származik (Renbaum és mtsai., 1990). Az enzim egy 386 aminosavból felépülő monomer fehérje mely processzíven metilálja a DNS-ben található CG dinukleotidokat. A metilálatlan és

A közelmúltban felfedezett másik bakteriális CG specifikus metiltranszferáz, az M.Mpel a *Malacoplasma* (korábban *Mycoplasma*) *penetrans* baktériumból származik és 395 aminosavból épül fel (Wojciechowski és mtsai., 2013). Az M.Mpel és az M.Sssl aminosav szekvenciája jelentős homológiát (44 % egyezés) mutat (12. ábra).

12. ábra: Az M.Sssl és M.Mpel aminosav szekvencia illesztése (ClustalO). A római számok a konzervált motívumokat jelölik. TRD: target recognising domain.

20

és M.HaeIII (PDB kód:1dct) enzimek szerkezetét vette alapul (Koudan és mtsai., 2004) (13. ábra).



13. ábra: Az M.Mpel és az M.SssI háromdimenziós szerkezetének összehasonlítása. Balra: az M.Mpel-DNS-Ado-Hcy terner komplex röntgendiffrakciós szerkezete. Jobbra: Az M.SssI-DNS-AdoHcy komplex számítógéppel prediktált modellje.

Az M.Mpel kristályosítása olyan duplaszálú DNS oligonukleoid jelenlétében történt, amely a metilálendő citozin helyén 5-fluorocitozint (5FC) tartalmazott. Az 5FC-ban található fluor atom gátolja a MTáz reakció utolsó lépését, az enzim és DNS közötti kovalalens kapcsolat felbomlását, lehetővé téve a specifikus enzim-DNS komplex vizsgálatát. Az M.Mpel, a többi bakteriális DNS- metiltranszferázhoz hasonlóan, egy kis és egy nagy doménből épül fel (13. ábra). A DNS kis árki felszínével kölcsönhatásba lépő nagy domén katalitikus zsebébe illeszkedik a kifordított 5FC, ahol a pirimidin gyűrű ötödik szénatomja megfelelő közelségbe kerül a katalitikus cisztein (C135) nukleofil tiol csoportjához. Az árván maradt guaninnal a Q141 aminosav létesít hidrogénhidat. A szekvencia felismerésért felelős TRD az M.Mpel esetében (az M.HhaI-hez hasonlóan) két fehérjehurokból áll (loop 1, loop 2), melyek a DNS nagy árki felszínén lépnek kölcsönhatásba a bázisokkal, illetve a cukor-foszfát gerinccel.

III. Célkitűzés

Emlősökben a CG specifikus C5-metiláció nélkülözhetetlen szerepet tölt be a génműködés szabályozásában, az egyedfejlődésben, a genom stabilitásának megőrzésében és számos más folyamatban. Az utóbbi években egyre több bizonyíték gyűlt össze arra, hogy bizonyos sejttípusokban a CG mellett a CA, CT, CC (röviden: CH) dinukleotidok is metilációs célhelyek lehetnek. Ennek az úgynevezett nem-CG vagy CH-metilációnak jelenleg nem ismert a biológiai szerepe.

A nem-CG metiláció kutatása szempontjából kihívást jelent, hogy ugyanazok az enzimek (Dnmt3a és Dnmt3B) felelősek a CG és CH metilációért is, s így nehéz befolyásolni a nem-CG metilációt anélkül, hogy a CG metiláció is megváltozna. A nem-CG metiláció szerepének tisztázásához tehát olyan CA/CT/CC specifikus DNS-metiltranszferázokra van szükség, melyek nem metilálják a kanonikus CG helyeket. Tudomásunk szerint jelenleg ilyen enzimek nem ismertek (Roberts és mtsai., 2023), ezért elhatároztuk, hogy kísérletet teszünk arra, hogy „fehérje engineering” technikák alkalmazásával létrehozzunk ilyen metiltranszferázokat.

Munkánkhoz kiindulási alapnak a bakteriális CG specifikus M.Mpel MTázt választottuk. Az M.Mpel-nek a szintén CG helyeket metiláló M.SssI-gyel szemben az az egyik előnye, hogy a háromdimenziós szerkezetére vonatkozó információk megbízhatóbbak (elérhető röntgendiffrakciós szerkezet a specifikus felismerőkomplexről). Továbbá, korábbi tapasztalataink alapján, az M.Mpel-gyel a kedvezőbb stabilitási és oldhatósági tulajdonságai miatt könnyebb dolgozni, mint az M.SssI-gyel (Albert és mtsai., 2018).

Doktori munkám során a következő célokat tűztük ki:

1. Olyan M.Mpel változatok előállítása helyspecifikus mutagenézissel, melyek specifikusa a CG-ről CN-re romlott, azaz hatékonyan képesek metilálni a kanonikus CG dinukleotidok mellett a CH helyeket is. A mutagenizálandó aminosavak kiválasztásához fel kívántuk használni az M.Mpel-DNS felismerőkomplex röntgenkristallográfiás szerkezeti modelljét.

2. Olyan CH helyeket (CA, CT, CC, vagy ezek bármilyen kombinációja) metiláló M.Mpel változatok létrehozása a relaxált specifitású mutánsokból (lásd: előző pont) kiindulva, melyeknek nincs vagy nagyon gyenge aktivitása van a kanonikus CG szubsztráton. Ezt véletlenszerű mutagenézissel és irányított evolúcióval kívántuk megvalósítani.

A kívánt mutáns enzimek fontos eszközök lehetnének a CH metiláció biológiai szerepének tanulmányozásában. A projekttől azt is reméltük, hogy az eredmények hozzájárulhatnak a DNS-metiltranszferázok szekvenciaspecifikus DNS-felismerésének jobb megértéséhez.

IV. Anyagok és módszerek

IV.1. Enzimek és reakciókörülmények

A plazmid DNS-ek illetve a PCR termékek emésztéséhez a Thermo Scientific és a New England Biolabs által forgalmazott restrikciós endonukleázokat használtuk. A DNS defoszforilálása FastAP termoszenzitív (Thermo Scientific) alkalikus foszfatáz felhasználásával történt. A foszforilálási reakciókhoz polinukleotid kinázt használtunk (Thermo Scientific). A ligálási reakciók T4 DNS ligáz (Thermo Scientific) felhasználásával történtek. A reakciókat a gyártó által előírt körülmények között, a megfelelő pufferekben végeztük.

IV.2. Oligonukleotidok

A munka során használt oligonukleotidok a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Oligonukleotid Szintézis Laboratóriumában készültek. Az oligonukleotidok szekvenciája és rövid leírása az 1. táblázatban látható.

oligo	szekvencia (5' – 3')	megjegyzés
AK463	CCAT <u>ACCAT</u> GGGCAATAG	'forward' PCR primer az M.MpeI gén amplifikálásához, NcoI hely aláhúzva
AK514	<u>GCG</u> AACAGTGAAACTATGTATACAAT	'forward' PCR primer az F302A mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK515	AGTTGTGTAATTTTAAAGAGGTCTT	'reverz' PCR primer az F302A, F302M, F302Q, F302Y, F302W mutációk beépítéséhez
AK541	AACTATGTATACAATATCAATG	'forward' PCR primer az E305A, E305S, Δ A323+N324G+E305Q, Δ A323+N324G+E305N, Δ A323+N324G+R326G+E305N, Δ [T301-E305] mutánsok létrehozásához
AK542 ¹	TGTGTAATTTTAAAG <u>AG</u> GTC	'reverz' PCR primer a Δ [T301-E305] mutáns létrehozásához
AK564	<u>CGC</u> ACTGTAAAAAGTTGTG	'reverz' PCR primer az E305A mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK565	<u>TGG</u> AACAGTGAAACTATGTATACAAT	'forward' PCR primer az F302W mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva

AK566	<u>AT</u> GAAACAGTGAAAACATGTATACAAT	'forward' PCR primer az F302M mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK567	<u>CAG</u> AACAGTGAAAACATGTATACAAT	'forward' PCR primer az F302Q mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK568	<u>TAT</u> AACAGTGAAAACATGTATACAAT	'forward' PCR primer az F302Y mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK579	<u>CTG</u> ACTGTTAAAAGTTGTG	'reverz' PCR primer az E305Q mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK580	<u>CCG</u> AACTCAAGAATTAATGAAAC	'forward' PCR primer az A323P mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK581	ACCAGATGCAGTAAGAGTTG	'reverz' PCR primer az A323P, ΔA323+N324G, A323G+S325G+E305A, S325G+E305A mutánsok létrehozásához
AK586	<u>GCT</u> ACTGTTAAAAGTTGTG	'reverz' PCR primer az E305S mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK603	<u>GGT</u> TCAAGAATTAATGAACTCAAC	'forward' PCR primer az N324G mutáció beépítéséhez, mutáció aláhúzva
AK702	GAATTATAAAA CG AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás mérésekhez, a CG szubsztráthely kék színnel jelölve
AK703	GTTTTATTTT ^{m5} CGTTTTATAATTC	
AK704	GAATTATAAAA CA AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás mérésekhez, a CA szubsztráthely kék színnel jelölve
AK705	GTTTTATTTTGTTTTATAATTC	
AK706	GAATTATAAAA CT AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás mérésekhez, a CT szubsztráthely kék színnel jelölve
AK707	GTTTTATTTTAGTTTTATAATTC	
AK708	GAATTATAAAA CC AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás mérésekhez, a CC szubsztráthely kék színnel jelölve
AK709	GTTTTATTTGGTTTTATAATTC	
AK714	GAGATGATTAT <u>CTAG</u> AAAAACAGG	'forward' primer 'error-prone' PCR-hez, XbaI hely aláhúzva

AK715	GGTGCTCGAGTTCCTC	'reverz' primer 'error-prone' PCR-hez, XhoI hely aláhúzva
AK739	CGTAAGCTTGGCTTTGTTAGCAGC	'reverz' PCR primer az M.Mpel gén amplifikálásához, HindIII hely aláhúzva
AK775	CTGCATCTGGT NNSNNSNNS ATTAATAATTGAAAC TCAACAAGGTG	'forward' PCR primer a ΔA323+N324G+E305A változat N324-R326 szakaszának random mutagenéziséhez, a randomizált kodonok félkövérrel kiemelve
AK776	TAAGAGTTGGCCAATACCATTGATATTG	'reverz' PCR primer, az AK775 párja
AK793	GCCAACTCTTACT NNSNNSNNS GGTTCAAGAAT TAAATGAACTCAAC	'forward' PCR primer a ΔA323+N324G+E305A változat A320-G322 szakaszának random mutagenéziséhez, a randomizált kodonok félkövérrel kiemelve
AK794	CCAATACCATTGATATTGTATACATAGTTCGC	'reverz' PCR primer, az AK793 párja
AK800	<u>GGCAACGGC</u> GAGAATTAATAATTGAACTCAACAA G	'forward' PCR primer az A323G+S325G+E305A mutáns létrehozásához, G323 és G325 kodonok aláhúzva
AK807	GCAAA <u>CGGC</u> GAGAATTAATAATTGAACTCAAC	'forward' PCR primer az S325G+E305A mutáns létrehozásához, G325 kodon aláhúzva
AK808	<u>GTTACTGT</u> TAAAAGTTGTG	'reverz' PCR primer a ΔA323+N324G+E305N és a ΔA323+N324G+R326G+E305N mutánsok létrehozásához (az N305 kodon reverz komplementere aláhúzva)
AK809	CAACTTTTAACAGT NNS AACTATGTATACAATATC AATGG	'forward' PCR primer a 305. aminosav telítési mutagenéziséhez, a randomizált kodon félkövérrel kiemelve
AK810 ¹	TGTAATTTTAAAG <u>AGG</u> TCTTGAAATGATG	'reverz' PCR primer, az AK809 párja
AK921	GAATTATAAAG CC AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK922	GTTTTATTTGGCTTTATAATTC	
AK923	GAATTATAAAT CC AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK924	GTTTTATTTGGATTATAATTC	
AK925	GAATTATAAAC CC AAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló

AK926	GTTTTATTTGGGTTTATAATTC	nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK927	GAATTATAAAAA CC TAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK928	GTTTTATTAGGTTTATAATTC	
AK929	GAATTATAAAAA CC GAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK930	GTTTTATTTGCGTTTATAATTC	
AK931	GAATTATAAAAA CC CAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK932	GTTTTATTTGGGTTTATAATTC	
AK946	CCATCTGCGTTGGATCCAACCG	részben komplementer oligonukleotidok Eco31I és Psp1406I kompatibilis túlnyúló végekkel, BamHI hely aláhúzva
AK947	CGCGGTTGGATCCAACGCAG	
AK948	CCATCTGCGTGGGATCCACCG	részben komplementer oligonukleotidok Eco31I és Psp1406I kompatibilis túlnyúló végekkel, BamHI hely aláhúzva
AK949	CGCGGTGGGATCCACGCAG	
AK967	GAATTATAAAG CC TAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK968	GTTTTATTAGGCTTTATAATTC	
AK969	GAATTATAAAG CC CAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK970	GTTTTATTTGGGCTTTATAATTC	
AK971	GAATTATAAAG CC GAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK972	GTTTTATTTGCGCTTTATAATTC	
AK973	GAATTATAAAT CC GAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK974	GTTTTATTTGCGATTATAATTC	
AK975	GAATTATAAAT CC CAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK976	GTTTTATTTGGGATTATAATTC	
AK977	GAATTATAAAT CC TAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló

AK978	GTTTTATTTAGGATTATAATTC	nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK979	GAATTATAAAC CC GAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK980	GTTTTATTTGGGTTTATAATTC	
AK981	GAATTATAAAC CC TAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK982	GTTTTATTTAGGGTTTATAATTC	
AK983	GAATTATAAAC CC CAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK984	GTTTTATTTGGGGTTTATAATTC	
AK987	GAATTATAAAA CC CTAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK988	GTTTTATTAGGGTTTATAATTC	
AK989	GAATTATAAAG CC CTAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK990	GTTTTATTAGGGCTTTATAATTC	
AK991	GAATTATAAAT CC CTAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK992	GTTTTATTAGGGATTATAATTC	
AK993	GAATTATAAAC CC CTAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok <i>in vitro</i> MTáz aktivitás méréshez, a CC helyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK994	GTTTTATTAGGGGTTTATAATTC	
AK1009	GTTTTATTG ^{m5} CGTTTATAATTC	
AK1010	GAATTATAAAA CG GAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok a vad típusú M.Mpel 3' végi nukleotid preferenciájának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK1011	GTTTTATTTC ^{m5} CGTTTATAATTC	
AK1012	GAATTATAAAA CG TAAATAAAAC	komplementer oligonukleotidok a vad típusú M.Mpel 3' végi nukleotid preferenciájának vizsgálatához, a szubsztráthely kék színnel jelölve
AK1013	GTTTTATTTA ^{m5} CGTTTATAATTC	

1. táblázat: A munka során felhasznált oligonukleotidok.

IV.3. Baktériumtörzsek

Munkánk során három *Escherichia coli* törzsszel dolgoztunk. A DH10B törzset a mutáns metiltranszferázok létrehozására, illetve egyéb klónozási műveletek során használtuk (Durfee és mtsai., 2008). A törzs genotípusa: *F – endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL ΔlacX74 80lacZΔM15 araD139 Δ (ara leu) 7697 mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) λ*. A mutáns metiltranszferázok termeltetése a restrikciós védési tesztekhez a ScarabXpress T7 *lac* (Scarab Genomics) vagy ER1821 (Jobling és mtsai., 2016) törzsben történt. Az ER1821 genitípusa: *F- glnV44 e14-(McrA-) rfbD1 relA1 endA1 spoT1 thi-1 Δ(mcrC-mrr)114::IS10*

IV.4. Plazmidok

A pET28-M.Mpe plazmid (Kn^R) (eredetileg: pET-28a::Mmpe) a vad típusú M.Mpel fehérje a C-terminálison hexahisztidinnel (6xH) fúzionált változatát kódolja (Wojciechowski és mtsai., 2013). Az M.Mpel gén transzkripciója a T7 bakteriofág promoter szabályozása alatt áll és a kifejeződése az allolaktóz analóg IPTG-vel indukálható. A plazmidot Matthias Botchler (IIMCB, Varsó) bocsátotta a rendelkezésünkre. Bizonyos esetekben az M.Mpel változatokat a pOK-BAD (Kn^R) vektorban klónoztuk (Tímár és mtsai., 2008), melyben a beépített gén kifejeződését az L-arabinózzal indukálható *araBAD* promoter biztosítja. Mindkét plazmid hordoz egy kanamicin-rezisztenciát biztosító gént, mely szelekciós markerként szolgál. A további plazmidok a munka során készültek. A plazmidok listáját az 2. táblázat tartalmazza.

Plazmid neve
pOK-BAD
pET28-MMpel
pET28-MMpel(F302A)
pET28-MMpel(F302M)
pET28-MMpel(F302Q)
pET28-MMpel(F302Y)
pET28-MMpel(F302W)

pET28-MMpel(E305A)
pET28-MMpel(E305S)
pET28-MMpel(E305Q)
pET28-MMpel(A323P)
pET28-MMpel(A323V)
pET28-MMpel(Δ [T301-E305])
pET28-MMpel(Δ G322)
pET28-MMpel(Δ A323)
pET28-MMpel(Δ N324)
pET28-MMpel(Δ [G322-A323])
pET28-MMpel(Δ [G322-N324])
pET28-MMpel(Δ A323+N324G)
pET28-MMpel(Δ A323+N324G+E305A)
pET28-MMpel(A323G+E305A)
pET28-MMpel(S325G+E305A)
pET28-MMpel(Δ A323+N324G+E305S)
pET28-MMpel(Δ A323+N324G+E305Q)
pET28-MMpel(Δ A323+N324G+E305N)
pET28-MMpel(Δ A323+N324G+E305W)
pOB-MMpel
pOB-MMpel(Δ A323)
pOB-MMpel(Δ A323+N324G+E305A)
pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305A)
pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)
pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-AK946

IV.5. Táptalajok, tenyésztési körülmények

Az általános klónozási munkák során a baktériumokat Lysogeny Broth (LB) (Green & Sambrook, 2012) tápoldatban, illetve táplemezen tenyésztettük. Összetétel 1 literre: 10 g NaCl, 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat. A szilárd táplemezek készítése agar hozzáadásával (1,5 % végkoncentráció) történt.

Fehérjetisztítás céljából a sejteket Terrific Broth (Green & Sambrook, 2012) tápoldatban tenyésztettük, melynek összetétele 1 liter végtérfogat esetében a következő: 20 g tripton, 24 g élesztő-kivonat, 4 ml glicerin, 100 ml foszfát puffer (0,17 M KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4).

Az elektroporálást követően a sejteket SOB (Super Optimized Broth) (Green és Sambrook, 2012) táptalajban regeneráltuk, melynek összetétele a következő: 2% tripton, 0,5% élesztőkivonat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO_4 , 10 mM MgCl_2 . A sejtek tenyésztése 37 °C, illetve 30 °C hőmérsékleten történt. A munka során antibiotikumokat a következő végkoncentrációban alkalmaztuk a táptalajokban:

- ampicillin (Ap): 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- kanamicin (Kn): 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

IV.6. Plazmid DNS tisztítása

A plazmid DNS tisztítása általában alkalikus feltárással történt 1,5 ml-es sejtkultúrákból kiindulva a standard protokoll alapján (Green és Sambrook, 2012). Ha nagy tisztaságú DNS mintákra volt szükség, például szekvenáláshoz, a GeneJET Plasmid Miniprep Kit-et (Thermo Fischer Scientific), vagy a NucleoSpin Plasmid Kit-et (Macherey-Nagel) használtuk. Nagyobb mennyiségű plazmid DNS izolálása a NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel) felhasználásával történt.

IV.7. Agaróz gélelektroforézis

A DNS fragmentumok méret szerinti elválasztásához 1 vagy 1,2% -os agaróz gélrt használtunk. Az elektroforézis pH 8.3-as TBE pufferben történt (50 mM Tris-HCl, 50 mM

bórsav, 1 mM EDTA). A DNS fragmentum méretek becsléséhez a GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fischer Scientific) szolgált viszonyítási alapnak. A DNS-t az ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution (Avegene Life Science), vagy a SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) fluoreszkáló festékek felhasználásával tettük láthatóvá. A gélek elkészítése az UVITEC CAMBRIDGE Essential V6 transzluminátor segítségével történt.

IV.8. DNS fragmentumok izolálása gélből

Fragmentumizolálás céljából az emésztett DNS mintát nagy tisztaságú agaróz (SeaKem GTG Agarose) felhasználásával készült gélben futtattuk. Az izolálni kívánt DNS fragmentumot tartalmazó géldarabot steril szikével vágtuk ki. A művelet során a DNS károsodás megelőzése érdekében a gél UV helyett kék fénnel világítottuk meg. A DNS tisztítása a Thermo Scientific által forgalmazott GeneJET Gel Extraction Kit, vagy a VIOGENE Gel/PCR Isolation System segítségével történt.

IV.9. DNS koncentráció meghatározás

A plazmidpreparátumok, illetve a tisztított PCR termékek koncentrációját a NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo Fischer Scientific) segítségével határoztuk meg.

IV.10. Ligátum tisztítása elektroporáláshoz

A ligátumhoz fél térfogat fenolt és fél térfogat kloroformot adtunk, majd a keveréket vortexezés után 2 percig centrifugáltuk 13000 rpm fordulatszámon. A felülúszót átpipettáztuk tiszta 1,5 ml-es eppendorf csőbe majd 1 térfogat kloroform hozzáadását és vortexezést követően centrifugáltuk (2 perc , 13000 rpm). A felülúszót egy tiszta eppendorf csőbe pipettáztuk majd a DNS kicsapása céljából 1/10 térfogat Na-acetátot és 2,5 térfogat abszolút etanolt adtunk hozzá. A keveréket 30 percen át inkubáltuk -20 °C-os mélyhűtőben, majd ezt követően 30 percig centrifugáltuk 4 °C-on (13000 rpm). A felülúszót eltávolítottuk és a csapadékot 70 %-os etanollal mostuk, majd beszárítottuk. Végül a csapadékot feloldottuk 10 µl UP vízben.

IV.11. Plazmid DNS bejuttatása baktériumsejtekbe

A baktériumsejtek transzformálása a Lederberg és Cohen által kidolgozott CaCl_2 -os módszerrel történt (Lederberg és Cohen, 1974). A kompetens sejtekhez maximum 4

μl plazmid DNS-t kevertünk, majd a szuszpenziót 30 percen át jégen inkubáltuk. Ezt követően a sejteket másfél percig 42 °C-os hőszekvenciákra tettük ki, majd 1 ml LB tápoldat hozzáadása után 1 órán át inkubáltuk 37 °C-os rázóinkubátorban. Végül a sejtsuszpenzióból 150 μL-t kiszélesztettünk a megfelelő antibiotikumot tartalmazó agar lemezekre.

Az irányított evolúciós kísérletek során, a nagyobb transzformációs hatékonyság érdekében elektroporálással juttattuk be a sejtekbe a mutáns plazmidkönyvtárat. Az elektrokompétens sejtek készítése a standard protokoll alapján történt (Green és Sambrook, 2012). Az elektrokompétens sejtekhez 1-3 μL tisztított ligátumot adtunk, majd a szuszpenziót átpipettáztuk 0,1 cm elektródatávolságú GenePulser (Bio-Rad) küvetákba. A transzformálást a Bio-Rad cég által gyártott MicroPulser elektroporáló készülékkel végeztük, 1,5 kV feszültségen. Az elektrosokkot követően 1 ml SOB táptalajt adtunk a sejtekhez, majd 1 órán át inkubáltuk azokat 37 °C-os rázótermosztátban. Végül a sejtsuszpenziót kiszélesztettük a megfelelő antibiotikumot tartalmazó LB lemezekre.

IV.12. Helyspecifikus mutagenézis

Az M.Mpel gén mutáns változatait egy inverz PCR-en alapuló technikával hoztuk létre (Silva és mtsai., 2017) (14. ábra). A mutagenézis során felhasznált primerek a 3. táblázatban láthatók.

Mutáció	Oligonukleotidok
F302A	AK514, AK515
F302M	AK566, AK515
F302Q	AK567, AK515
F302Y	AK568, AK515
F302W	AK565, AK515
E305A	AK564, AK541
E305S	AK586, AK541

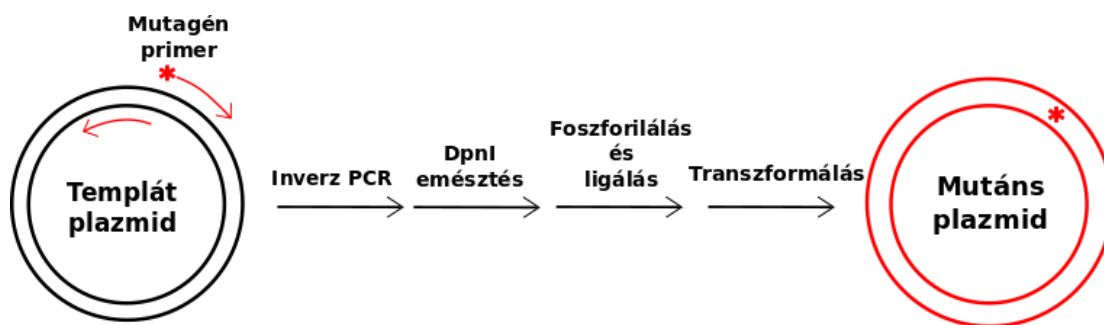
E305Q	AK579, AK541
Δ [T301-E305]	AK541, AK542
A323P	AK580, AK581
N324G	AK603, AK581
A323G+S325G+E305A	AK800, AK581
S325G+E305A	AK807, AK581
Δ A323+N324G+E305N és Δ A323+N324G+R326G+E305N	AK541, AK808
305. pozíció, random mutagenesis	AK809, AK810
320-322 szakasz, random mutagenesis	AK793, AK794
324-326 szakasz, random mutagenesis	AK775, AK776

3. táblázat: A helyspecifikus mutagenesis kísérletek során használt oligonukleotidok. Az oligonukleotidok szekvenciája az 1. táblázatban látható.

A PCR reakció a következő összetevőkből állt (20 μ l térfogatban): 1 ng templát plazmid (pET28-M.Mpel, vagy annak olyan változatai, melyek mutáns M.Mpel gént tartalmaznak), primerek (0,5 μ M), 0,2 μ M dNTP mix, 1x Phusion HF buffer, 0,5 U Phusion DNS polimeráz.

Az alkalmazott program: 98 °C, 2 perc, 30x{98 °C, 20 másodperc, 52 °C, 20 másodperc, 72 °C 2 perc}, 72 °C 10 perc.

A PCR-t követően a templát plazmid eltávolítása céljából a reakcióelegyhez hozzámértünk 10 egység DpnI restriktációs endonukleázt, amely kizárólag Dam+ sejtekből származó, G^{m6}ATC metilációt tartalmazó DNS-t emészt meg. Az emésztést 30 percig végeztük 37 °C-on. A lineáris PCR termék foszforilálásához és ligálásához a következő reakciót mértük össze 20 μ l végtérfogatban: 4 μ l DpnI kezelt PCR termék, 1x T4 DNS ligáz puffer, 1U T4 DNS ligáz, 0,1 U polinukleotid kináz, 0,5 mM ATP. A ligátumból 3-4 μ l-t transzformáltunk kémiai kompetens DH10B sejtekbe. A transzformánsokat kanamicin tartalmú lemezen szelektáltuk. A mutáció beépülését a plazmid M.Mpel gént kódoló részének szekvenálásával ellenőriztük.



14. ábra: Az inverz PCR alapú helyspecifikus mutagenézis folyamata

IV.13. Error-prone PCR mutagenézis

Az *M.MpeI*(Δ A323+N324G+E305A) tripla mutánst kódoló gén egy 486 bázispáros szakaszát a Taq DNS polimeráz segítségével mutagenizáltuk. A téves nukleotidbeépülések gyakoriságának növelése érdekében olyan dezoxi-nukleotid trifoszfát (dNTP) keverékeket készítettünk melyekben a négy természetes dNTP közül az egyiket (dATP vagy dTTP) részben dITP-vel helyettesítettük. A keverékek összetétele a következő volt:

- 1) 25-25 mM dGTP, dCTP, dTTP, 5 mM ATP, 20 mM dITP
- 2) 25-25 mM dGTP, dCTP, dATP, 5 mM TTP, 20 mM dITP.

A PCR reakcióelegy (50 μ l végtérfogat) a következő komponensekből állt: 1x Taq puffer, 9 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP keverék, 0,2 μ M oligonukleotid primerek (AK714 és AK715), 1 ng templát DNS, 2,5 egység Taq DNS polimeráz. Az alkalmazott program: 94 °C 3 perc, 30x {94 °C, 30 másodperc, 47 °C, 30 másodperc, 72 °C 2 perc}, 72 °C 5 perc.

IV.14. DNS szekvencia meghatározás

A plazmidok releváns részének nukleotidsorrendjét automata Sanger szekvenálással határozták meg a Szegedi Biológiai Kutatóközpont vagy a Delta Bio 2000 Kft. szekvenáló laboratóriumában.

IV.15. A mutáns fehérjék túltermeltetése

A mutáns fehérjét kódoló plazmidot ScarabExpress T7 *lac* sejtekbe transzformáltuk. A transzformánsokat Kn tartalmú agar lemezen szelektáltuk. Egy telepet leoltottunk 5 ml LB(+Kn) starterkultúrába, melyet 37 °C-on inkubáltunk 16 órán át. A starterkultúrából 100x hígításban átoltottunk 20 ml TB táptalajba. A sejteket 37 °C-on növesztettük addig, amíg a tenyészet optikai denzitása (OD600) el nem érte a 0,5-ös értéket. A fehérje termelődését 0,4 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. A sejteket 30 °C-on rázattuk 1-5 órán át.

IV.16. SDS-poliakrilamid gélelektroforézis

Az SDS-poliakrilamid gélelektroforézist az általános protokoll szerint végeztük (Sambrook és Russell, 2006). A mintákat 10 %-os gélen futtattuk és a fehérjéket Coomassie Brilliant Blue festékkel tettük láthatóvá. A fehérjék molekulatömegének becslése a PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific) marker segítségével történt.

IV.17. Fehérjetisztítás

A C-terminálisan hexahisztidinhez (6xHis) fúzionált vad típusú és mutáns M.Mpel fehérjék tisztítása Ni-affinitás kromatográfiával történt. Kisebb mennyiségű fehérje tisztításához a His-Spin Protein Miniprep kitet (Zymo Research) használtuk. A tisztítandó metiltranszferázt kódoló plazmidot ScarabXpress T7 *lac* sejtekbe transzformáltuk. A sejteket 20 ml TB tápoldatban növesztettük 37 °C-on OD550 = 0,5 sűrűségig. A fehérje kifejeződését 0.4 mM IPTG hozzáadásával indukáltuk. A sejteket további 5 órán át növesztettük 30 °C -on. A kultúrából 10 ml-t lecentrifugáltunk (4500 rpm, 10 perc) majd felfuszpendáltuk 1 ml His Binding Buffer-ben. A sejteket ultrahangos kezeléssel tártuk fel. A homogenizátumot lecentrifugáltuk (12000 rpm, 5 perc, 4 °C), majd a felülúszóval dolgoztunk tovább a gyártó utasításait követve. Az eluált fehérje tisztaságának ellenőrzésére SDS-poliakrilamid gélelektroforézist használtunk. A tisztított fehérjét dialízissel (Pur-A-Lyzer Mini 12000 dialízis kit, Sigma - Aldrich) töményítettük, majd a mintát –20 °C-os mélyhűtőben tároltuk a felhasználásig. A dialízispuffer összetételére a következő volt: 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 10 mM β -merkaptoetanol, 50% glicerol. A tisztított fehérje koncentrációjának becsléséhez a preparátumból 1 μ L-t ismert

koncentrációjú tisztított WT-M.Mpel különböző hígításai mellett futtattunk SDS-poliakrilamid gélen.

Nagyobb mennyiségű fehérje tisztításához Ni-agaróz oszlopot használtunk (His-Select, Sigma-Aldrich) 400 ml, 5 órán át indukált sejt kultúrából kiindulva. A fehérjét tartalmazó eluált frakciókat dialíziszacskókba pipettáztuk és a fent leírt összetételű pufferrel szemben dializáltuk. A töményített fehérje koncentrációját a minta 280 nm hullámhosszon mért optikai denzitása alapján határoztuk meg. A fehérje moláris extinkciós koefficiensét a ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) program segítségével számoltuk ki.

A fehérjepreparátumok tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük.

IV.18. A metiltranszferáz változatok aktivitásának és specifikitásának jellemzése

IV.18.1. Plazmid védettségi teszt

A metiltranszferáz változatok aktivitásának, illetve szekvenspecifikitásának jellemzéséhez kihasználtuk, hogy bizonyos restrikciós endonukleázok nem hasítanak, ha az enzim felismerőhelyében található citozin(ok) C5-metiláltak. Attól függően, hogy a szóban forgó citozint milyen bázis követi 3' irányban, az emésztést a CA, CG, CT vagy CC dinukleotidok metilációja is gátolhatja. Az emésztési mintázat alapján következtetni lehet a metiltranszferáz specifikására. A munka során használt enzimek az 4. táblázatban láthatók.

restrikciós enzim	felismerő-szekvencia	az emésztést gátló ^{m5} C metiláció	tesztelhető metiláció specifikitás
Alw44I	GTGCAC CACGTG	GTGCAC <u> </u> CACGTG	<u>C</u> N
BamHI	GGATCC CCTAGG	GGAT <u>C</u> C CCTAGG	<u>CC</u>
Bsh1236I	CGCG GCGC	<u>C</u> GCG CG <u>C</u> G GCGC GCGC	<u>CG</u>
BsuRI	GGCC CCGG	GG <u>C</u> C CCGG	<u>CC</u>
Eco47I	GGWCC CCWGG	GGW <u>C</u> C CCWGG	<u>C</u> N

Hin6I	GCGC CGCG	G <u>C</u> GC CG <u>C</u> G	<u>C</u> G
MspI	CCGG GGCC	<u>C</u> CGG GGCC	<u>C</u> C
NcoI	CCATGG GGTACC	<u>C</u> CATGG GGTACC	<u>C</u> C
XmiI	GTMKAC CAKMTG	GTMK <u>A</u> C <u>C</u> AKMTG	<u>C</u> N

4. táblázat: Az *M.Mpel* mutánsok specifikálásának tesztelésére használt restriktációs enzimek. A metiláció-érzékenységre vonatkozó információk a REBASE weboldaltól származnak. Aláhúzással jelöltük a citozinokat, melyek C5-metilációja gátolja az emésztést.

A védési tesztekhez a mutáns MTáz változatokat kódoló plazmidokat ScarabXpress T7 *lac* vagy ER1821 sejtekbe transzformáltuk. A metiltranszferáz kifejeződését 0,4 mM IPTG-vel vagy 0,1% arabinózzal indukáltuk. A sejteket 5 órán át ráztuk 30 °C-on, majd plazmid DNS-t izoláltunk. A plazmidokból ~500 ng-ot a táblázatban látható metilációra érzékeny restriktációs enzimekkel emésztettünk és a keletkezett fragmentumokat agaróz gélelektroforézissel vizsgáltuk.

IV.18.2. Trícium beépülésen alapuló MTáz aktivitásmérés

A metiltranszferáz változatok különböző szubsztrátokon mutatott aktivitásának *in vitro* mérését a (Greene és mtsai., 1975; Slaska-Kiss és mtsai., 2012) által közölt módszerrel végeztük.

A standard reakció összetétele a következő volt: 2 µM dupla szálú oligonukleotid DNS szubsztrát, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 µM S-adenozil-L-[metil-3H]metionin, 0,1 mg/ml BSA, tisztított *M.Mpel* (vad típusú vagy mutáns)

Az radioaktívan jelölt S-adenozil-L-[metil-3H]metionint (specifikus aktivitás: 555 Bq/pmol) a Perkin Elmer-től szereztük be. A mérésekhez 130 Bq/pmol specifikus aktivitású preparátumot készítettünk úgy, hogy a gyári preparátumhoz nem radioaktív SAM-ot (New England Biolabs) adtunk.

DNS szubsztrátnak 23 bázispár hosszúságú duplaszálú oligonukleotidokat használtunk. (Az oligonukleotid-párok szekvenciáját és rövid leírását az 1. táblázat tartalmazza.)

Az enzim hozzáadását követően a mintákat 30 °C-on inkubáltuk, majd a reakciót 4 µl 10%-os SDS-sel állítottuk le. A mintákat 2x2 cm-es négyzet alakú DE81 (Whatman) papírdarabokra pipettáztuk, majd a papírnégyzeteket háromszor mostuk 50 mM töménységű Na₂HPO₄ oldatban és kétszer 100%-os etanolban. A megszáritott papírdarabokat Ultima Gold MV (Perkin Elmer) szcintillációs koktéllal itattuk át. A DNS-be beépült trícium aktivitását Tri-Carb 2100TR folyadékszintillációs detektorral mértük meg.

A DNS-szubsztrátra vonatkozó steady-state kinetikai paraméterek meghatározásához a vad típusú enzimet 5 nM, az M.Mpel(Δ323A+N324G+R326G+E305N) négyes mutáns változatot 350 nM koncentrációban adtuk a reakcióhoz, amely 5 µM [metil-3H]-SAM-ot és változó koncentrációjú oligonukleotid szubsztrátot tartalmazott.

IV.19. Bioinformatikai módszerek

A klónozási munkák, a PCR primerek megtervezése a SnapGene nevű szoftverrel történt. A plazmidjaink *in silico* emésztését és az agaróz gélelektroforézis szimulációját a NEBCUTTER 2.0 webalkalmazással végeztük (Vincze, Posfai, és Roberts 2003). A dolgozatban szereplő saját készítésű ábrák egy része a nyílt forráskódú *Inkscape* vektorgrafikus rajzolóprogrammal készültek (<https://inkscape.org/>). Az M.Mpel-DNA-AdoHcy terner komplex (4dkj) atomi koordinátáit tartalmazó PDB fájlt a RCSB PDB weboldaláról (<https://www.rcsb.org/>) szereztük be.

A mutáns M.Mpel változatok szerkezeti modelljeit az I-TASSER platform segítségével állítottuk elő (Roy, 2010 #27). A háromdimenziós fehérjeszerkezetek megjelenítéséhez a PyMOL (Schödinger Inc.) molekulamodellező szoftver 2.2.0 verziószámú változatát használtuk. Az aminosavszekvencia-illesztések a Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) szoftverrel készültek.

A diagrammok a GraphPad Prism 3, a plazmidtérképek a Clone Manager 10 szoftverrel készültek.

V. Eredmények

V.1. A vad típusú M.Mpel szekvenciaspecifitása

Számos olyan DNS-metiltranszferáz ismert (például M.HaeIII, M.EcoKDam, M.BamHI), melyek szekvenciaspecifitása nem teljesen szigorú, azaz, általában kis hatékonysággal, a kanonikus felismerőhelytől egy-két nukleotidban eltérő szekvenciákat is metilálnak (Borgaro és mtsai., 2013). Az ilyen másodlagos aktivitások fontos szerepet játszanak az enzimevolúcióban, mivel megfelelő szelekciós nyomás hatására elsődleges aktivitássá válhatnak és ezáltal új enzimek jöhetnek létre (Khersonsky és mtsai., 2006). A DNS - metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának mesterséges megváltoztatását célul kitűző kísérletek során több esetben is sikerrel építettek erre a jelenségre (Cohen és mtsai., 2004; Rockah-Shmuel & Tawfik, 2012; Tímár és mtsai., 2004).

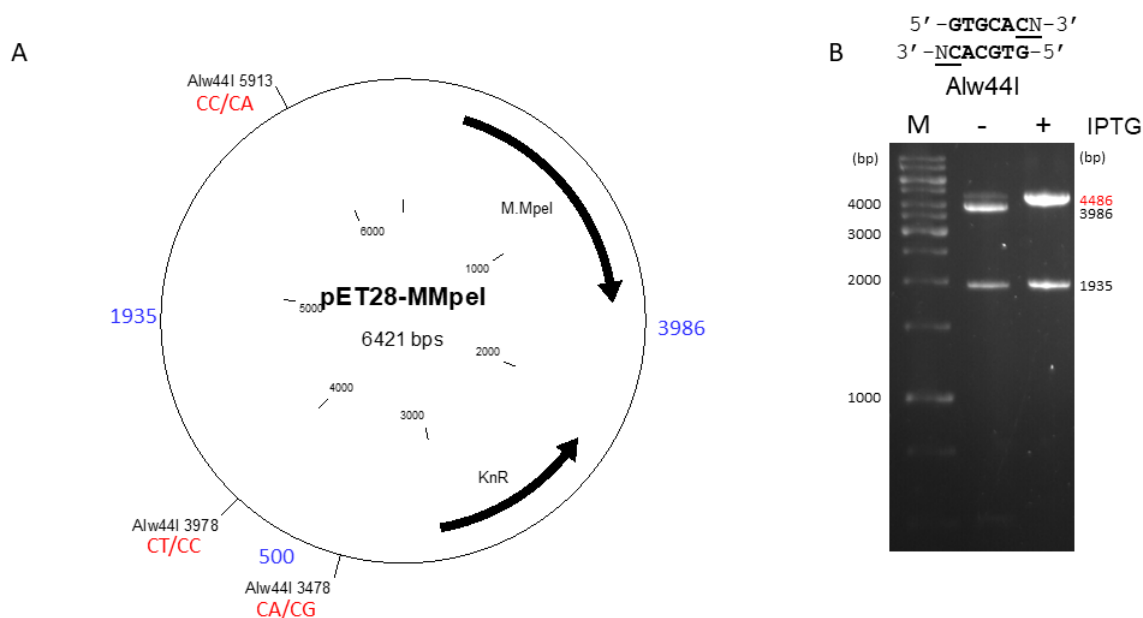
Kíváncsiak voltunk arra, hogy a CG specifikus enzimként ismert M.Mpel mutat-e másodlagos aktivitást a CH (CA, CC, CT) helyek esetében, mely felhasználható lenne kiindulási alapnak a nem-kanonikus helyeket metiláló enzimek létrehozására.

A pET28-MMpel plazmid a vad típusú, a C-terminálison hexahisztidint (H₆) hordozó változatának génjét tartalmazza. Az enzim kifejeződését T7 bakteriofág promotor biztosítja. A plazmid szekvenálását követően észrevettük, hogy az azon kódolt M.Mpel fehérje N-terminális részének aminosavszekveniája (Met-Gly-Asn-Ser) eltér az NCBI adatbázisban közölt vad típusú M.Mpel szekvenciától (Met-Asn-Ser) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/4DKJ_A). Annak érdekében, hogy eredményeink a korábbi adatokkal könnyebben összevethetők legyenek, munkánk során fenntartottuk az aminosavak korábbi számozását.

Az M.Mpel általi metiláció specifitásának vizsgálatához a pET28-MMpel plazmidot ScarabXpress T7 lac *E. coli* sejtekbe transzformáltuk, majd a MTáz kifejeződését IPTG-vel indukáltuk. A sejtekből izolált plazmidot három C5-metilációra érzékeny restrikciós endonukleázzal (Alw44I, XmiI, BsuRI) emésztettük.

Az Alw44I a 5'-GTGCAC-3' szekvenciát ismeri fel és nem hasít, ha a 3' végi citozin akár csak az egyik szálon is metilált (5'-GTGCA^{m5}C/5'-GTGCAC) (Roberts és mtsai., 2023). Az Alw44I általi emésztést a CG, CA, CT és CC metiláció is gátolhatja, attól függően, hogy

milyen nukleotidok határolják a felismerőhely 3' végeit. A pET28 plazmidban található három Alw44I (15/A. ábra) hely együttesen alkalmas valamennyi CN dinukleotid változat metilációjának kimutatására.

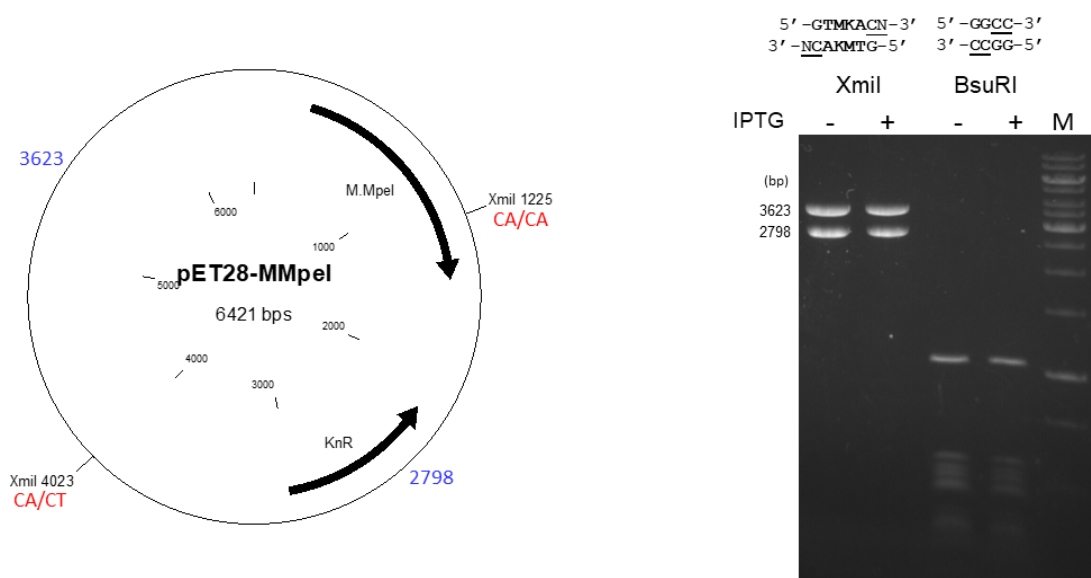


15. ábra: A vad típusú *M.Mpel* szekvenciaspecifitásának tesztelése a pET28-MMpel plazmid Alw44I emésztésével. A: A plazmid térképe az Alw44I helyekkel. A kék számok a teljes emésztés esetén keletkező DNS-fragmentumok méretét jelölik. Az egyes Alw44I helyekkel átfedő CN dinukleotidok piros színnel vannak jelölve. B: Az indukátlan és IPTG indukált sejteltől izolált plazmidok Alw44I emésztési mintázata. A védett fragmentum mérete piros színnel kiemelve. M: GeneRuler 1 kb DNA ladder.

Az 15/B ábrán látható az indukátlan és indukált sejteltől izolált plazmidok Alw44I emésztési képe. Az indukció következtében egyetlen védett fragmentum (4486 bp) jelent meg a gélen, mely a 3478-as Alw44I helyben történt metilációra utal. Ezen Alw44I hely 3' végeit G, illetve A nukleotidok szegélyezik, tehát az emésztést itt CG és CA metiláció is gátolhatja. Az CA dinukleotidok metilációja miatti védettség kizárható, mivel akkor az 5913-as Alw44I hely is védett lenne az emésztéssel szemben, tehát egy 5921 (1935 + 3986) és/vagy egy 6421 (1935 + 3986 + 500) bázispáros fragmentum is megjelent volna a gélen. Az emésztési képen nincs jele a CC és CT specifikus metilációnak sem: Ha a CC helyek metiláltak lennének, a 6421, 5921, 2435 bázispáros fragmentumok jelentek volna meg a gélen. A CT specifikus metiláció pedig a 2435 bp-os fragmentum megjelenését eredményezné.

Az XmiI restrikciós enzim az 5'-GTMKAC-3' (M = A vagy C, K = G vagy T) szekvenciát ismeri fel és nem hasít ha a 3' végi citozin metilált (Roberts és mtsai., 2023). A pET28-MMpel plazmidban két XmiI hely található (16. ábra). Az egyik hely (1225-ös pozíció) 3' végeit adenin határolja a DNS mindkét szálán, tehát itt a CA metiláció véd az emésztéssel szemben. A másik helyet (4023) a CA és/vagy CT metiláció is gátolhatja.

A BsuRI a 5'-GGCC-3' tetranukleotidot ismeri fel, melyből 23 található a pET28-M.Mpel plazmidban. Ha az aláhúzott citozin legalább az egyik szálon metilálódik, az emésztés gátolt, tehát ez az enzim alkalmas a CC dinukleotidok metilációjának kimutatására (Roberts és mtsai., 2023). (A 3' végi citozin metilációja nem befolyásolja az emésztést.)



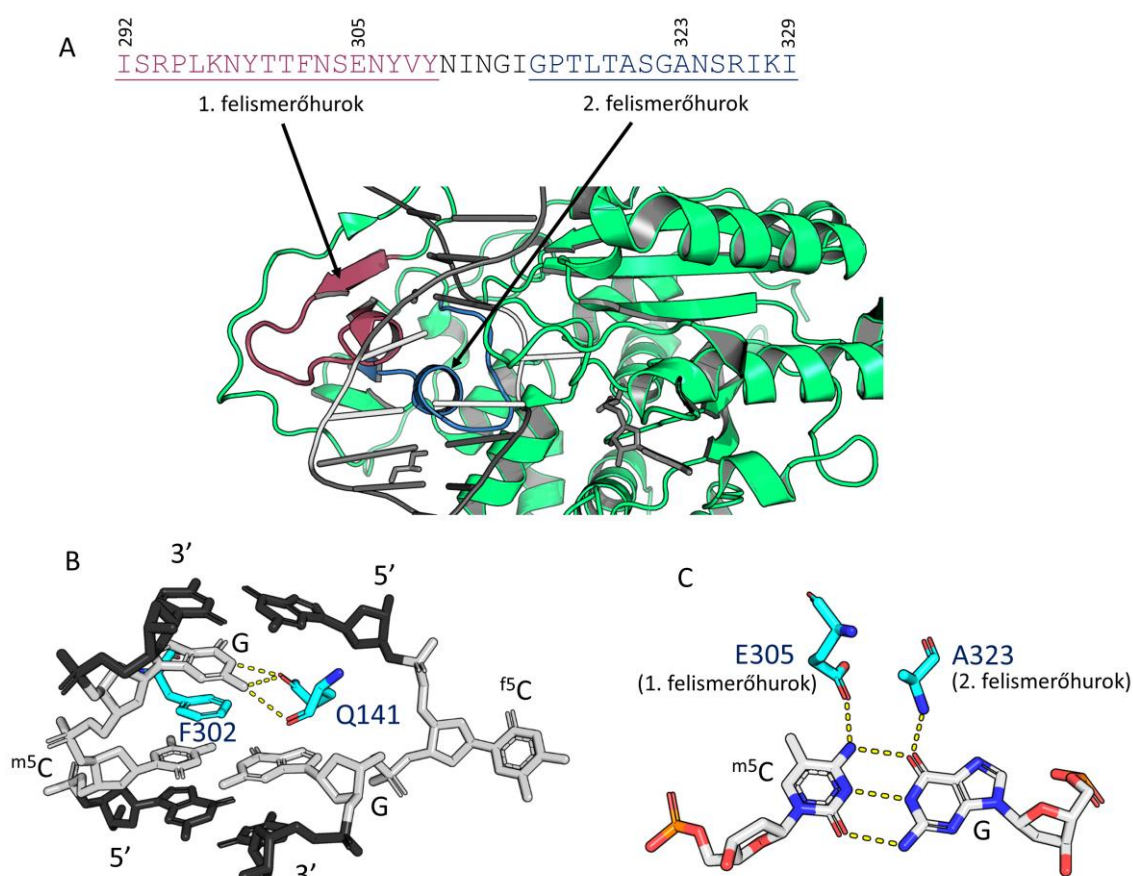
16. ábra: A vad típusú M.Mpel szekvenciaspecifitásának tesztelése a pET28-MMpel plazmid XmiI és BsuRI emésztésével. Balra: A pET28-MMpel plazmid térképe az XmiI helyekkel. A kék számok a teljes emésztés során keletkező DNS-fragmentumok méretét jelöli. Az adott XmiI hellyel átfedő CN dinukleotidok pirossal vannak jelölve.

Az 16. ábrán látható, hogy mind az XmiI, mind a BsuRI teljesen megemészteti az indukált sejtekből izolált pET28-MMpel plazmidot, ami megerősíti az Alw44I emésztéssel kapott eredményeket: az M.Mpel-nek nincs kimutatható aktivitása a CH dinukleotidokban. Ezen eredmények összhangban vannak a (Wojciechowski és mtsai., 2013) által közölt biszulfitos szekvenálási adatokkal. Fontos megjegyezni, hogy annak

ellenére sem láttunk nem-kanonikus metilációra utaló védettséget, hogy a vizsgált plazmidokat olyan sejtekből izoláltuk, melyek túltermelték a metiltranszferázt. Az M.Mpel szekvensziaspecifitásának mértéke tehát figyelemre méltóan magas a DNS-metiltanszferázok körében.

V.2. Az M.Mpel általi specifikus DNS felismerésben szerepet játszó kölcsönhatások

A M.Mpel és a hemimetilált CG felismerőhely (5'-^{m5}CG-3'/5'-CG-3') közötti fontosabb kölcsönhatásokat az enzim-DNS specifikus felismerőkomplex röntgendiffrakciós szerkezeti modellje (PDB: 4dkj) alapján az 17. ábra szemlélteti.



17. ábra: Az M.Mpel szekvensziaspecifitásának szerkezeti háttere. A: A CG dinukleotid nagy árki felszínével kölcsönhatásba lépő két felismerőhurok. B: A nem-szubsztrát szálaban lévő C és G közé ékelődő fenilalanin (F302) és az árva guaninnal hidrogénhidat létesítő glutaminsav (Q141). C: Az M.Mpel és a CG dinukleotid második bázispárjával létesített specifikus kölcsönhatások.

A szekvensziaspecifitásért felelős TRD két fehérjehurkot tartalmaz, melyek a DNS nagy árki felszínével érintkeznek (17/A. ábra). Az 1. felismerőhurok (Ile292 - Tyr309) a

nem-szubsztrát DNS szálát ismeri fel, míg a 2. felismerőhurok (Gly315 - Ile329) elsősorban a metilálendő citozint tartalmazó szállal létesít kölcsönhatásokat.

A kifordított citozin helyét a nagy doménben található 141-es glutamin oldallánca foglalja el, mely hidrogénhidakat létesít az árván maradt guaninnal (17/B. ábra).

Az M.Mpel-DNS komplex talán legszembetűnőbb vonása az 1. felismerőhurokban elhelyezkedő 302-es fenilalanin aromás oldalláncának beékelődése a nem-szubsztrát szálaban található m^5C és a G közé (17/B. ábra), melynek következtében a bázissíkok közötti távolság a normális duplájára növekszik. Ez a jellegzetes DNS torzítás feltehetőleg egy indirekt szekvenciafelismerési mechanizmus része.

A CG és a CH dinukleotidok közötti különbségtételben a legfontosabb szerepe a felismerőhely második (C:G) bázispárjával létesített specifikus kölcsönhatásoknak lehet. Az 1. felismerőhurokban található 305-ös glutaminsav oldallánc karbonil oxigénje hidrogénhidat fogad a nem szubsztrát szálaban elhelyezkedő m^5C N4-es nitrogénjétől. A 2. felismerőhurokban található 323-mas alanin főlánci amino csoportja hidrogénhidat létesít a szubsztrát szálaban elhelyezkedő guanin O6 atomjával (17/C. ábra).

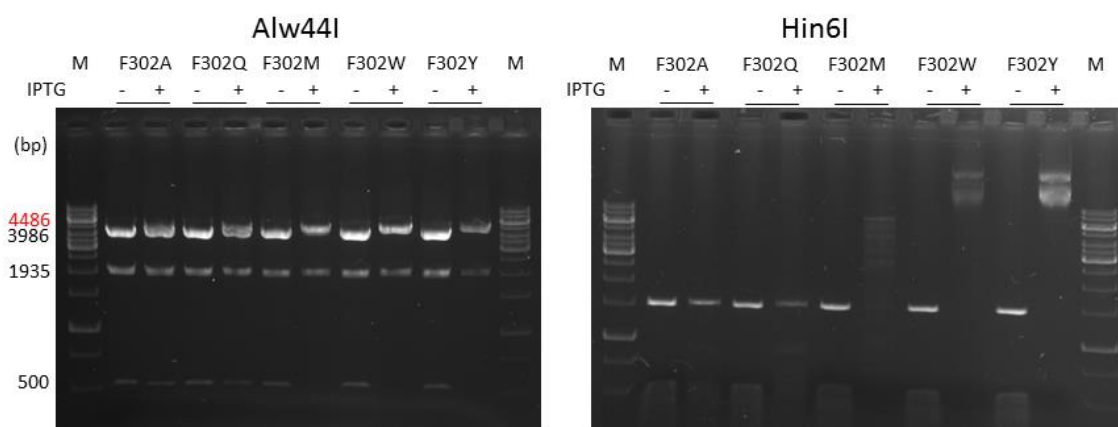
V.3. Relaxált specifitású M.Mpel változatok előállítása helyspecifikus mutagenezissel

Munkánk első lépésében helyspecifikus mutagenezissel olyan M.Mpel változatokat akartunk előállítani, melyek specifitása rosszabb, mint a vad típusú enzimé, tehát képessé váltak a CG dinukleotidok mellett a CH helyekben található citozinokat is metilálni. A specifitás-változást az enzim és a CG szubsztráthely közötti kölcsönhatások megzavarásával kívántuk elérni. Gondolva arra, hogy a keresett, relaxált specifitással rendelkező mutánsok a genom megnövekedett metilációja miatt toxikusak lehetnek a sejtek számára, a mutánsokat a pET28-Mpe plazmiban készítettük el, amelyben az M.Mpel gén csak akkor íródik át, ha a gazda baktérium T7 RNS polimerázt termel. A mutációkat az **Anyagok és módszerek** fejezetben ismertetett inverz PCR alapú technikával építettük be a metiltranszferázt kódoló szekvenciába.

V.3.1. F302 mutánsok

Először azt akartuk megvizsgálni, hogy a CG hely nem-szubsztrát szálabá ékelődő fenilalanin cseréjének van-e hatása az enzim szekvenciaspecifitására. Öt M.Mpel

változatot készítettünk, melyekben a 302-es fenilalanint alaninra, metioninra, glutaminra, tirozinra, illetve triptofánra cseréltük ki (F302A, F302Q, F302M, F302W, F302Y).



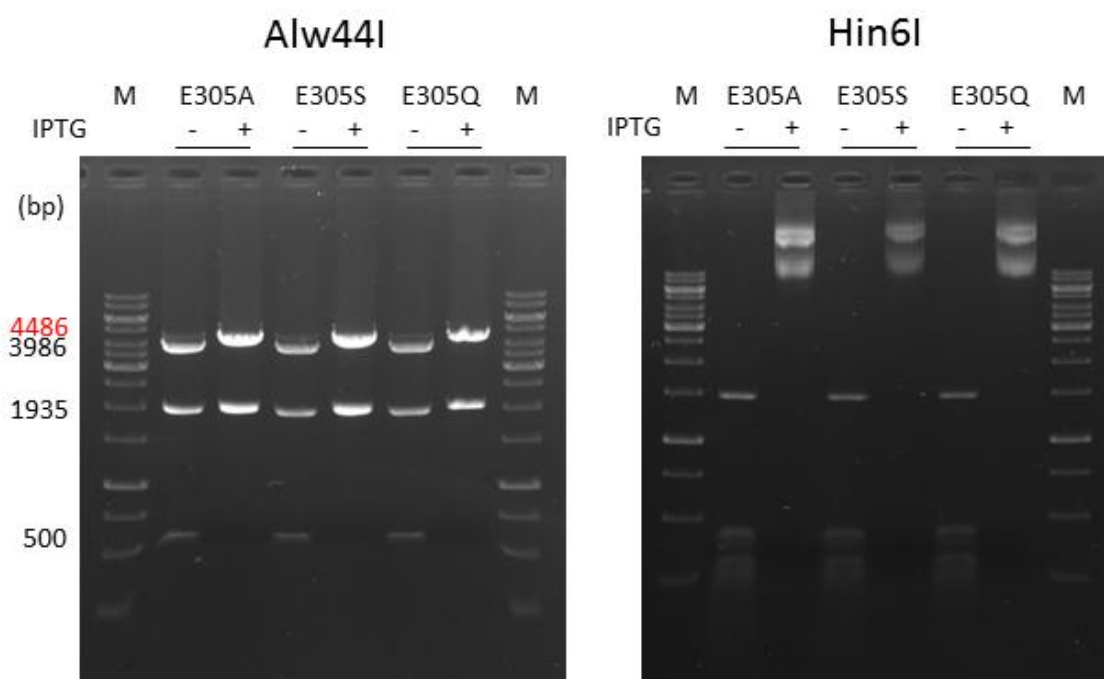
18. ábra: Az F302 mutánsok szekvensspecifitásának vizsgálata. A pET28-MMPel(F302A/Q/M/W/Y) plazmidok Alw44I és Hin6I emésztési képe. Az Alw44I emésztési mintázat értelmezéséhez lásd a 15. ábrán található plazmidtérképet.

A mutánsokat kódoló plazmidok Alw44I emésztési mintázata arra engedett következtetni, hogy egyik változat sem vált képessé a CH helyek metilációjára. Az IPTG-vel indukált sejtekből izolált plazmidok esetében kizárólag a 3478-as Alw44I hely volt védett részlegesen (F302A, F302Q) vagy teljesen (F302M, F302W, F302Y), ami arra utal, hogy a mutánsok megőrizték a CG specifitást (18. ábra).

Az egyes mutánsok CG metilációs aktivitásának becslése érdekében Hin6I emésztést is végeztünk (18. ábra). A Hin6I nem vág, ha a felismerőhelyében (5'-GCGC-3') található CG dinukleotid mindkét szálon metilált (Roberts és mtsai., 2023). A pET28-MMPel plazmidban 46 Hin6I hely található. Az emésztési kép alapján azon változatok mutatták a legnagyobb CG specifikus aktivitást, melyek aromás aminosavakat tartalmaztak a 302-es pozícióban (F302W, F302Y). Ezen esetekben az indukált sejtekből izolált plazmidok teljesen védettek voltak a Hin6I emésztéssel szemben. Az F302M mutáns MTáz aktivitása kisebb, mivel kifejeződése csak részleges védettséget biztosított a plazmidnak. A leggyengébb CG metilációs aktivitással az F302A és F302Q változatok rendelkeznek, ezen esetekben a plazmidok szinte teljesen megemésztődtek.

V.3.2. E305 mutánsok

A következő kísérletekben az enzim és a CG felismerőhely második bázispárja közötti kölcsönhatásokat próbáltuk megzavarni. Az 1. felismerőhurokban található E305 a nem-szubsztrát szálban elhelyezkedő citozinnal létesít hidrogénhidat (17/C. ábra). Három mutáns változatot hoztunk létre, melyekben a 305-ös glutaminsavat alaninra, szerinre, illetve glutaminra cseréltük. Az indukált sejtekből izolált plazmidok Alw44I emésztési mintázata alapján egyik mutáns sem rendelkezett nem-kanonikus aktivitással. A 3778-as Alw44I hely mindhárom esetben teljesen védett volt, illetve a Hin6I emésztésnek is ellenálltak a plazmidok, tehát a mutánsoknak jelentős CG specifikus aktivitása volt (19. ábra).

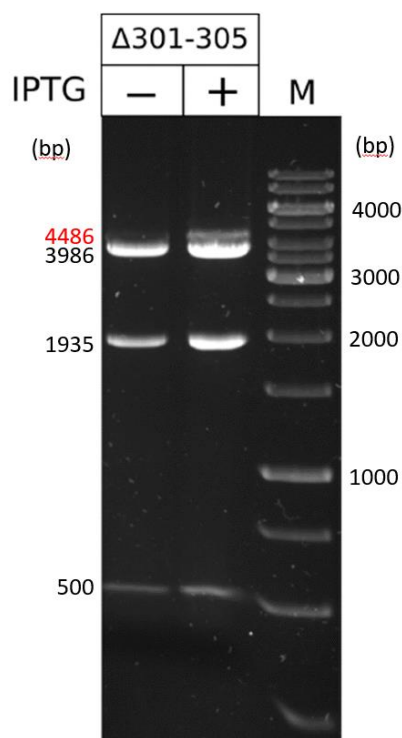


19. ábra: Az E305 mutánsok szekvenciaspecifitásának tesztelése. A pET28-MMpel(E305A/S/Q) plazmidok Alw44I és Hin6I emésztési képe.

V.3.3. Deléció az 1. felismerőhurokban

Mivel az aminosavcserék nem vezettek eredményre, a következő lépésben drasztikusabb módon, egy öt aminosavas deléció létrehozásával próbáltuk megzavarni az 1. felismerőhurok és a DNS közötti kölcsönhatásokat. Az Alw44I emésztés alapján a Δ [T301-E305] mutáns gyenge CG specifikus aktivitással rendelkezett (a 3778-as Alw44I

hely részlegesen védett), nem kanonikus metilációt továbbra sem tudtunk kimutatni (20. ábra).



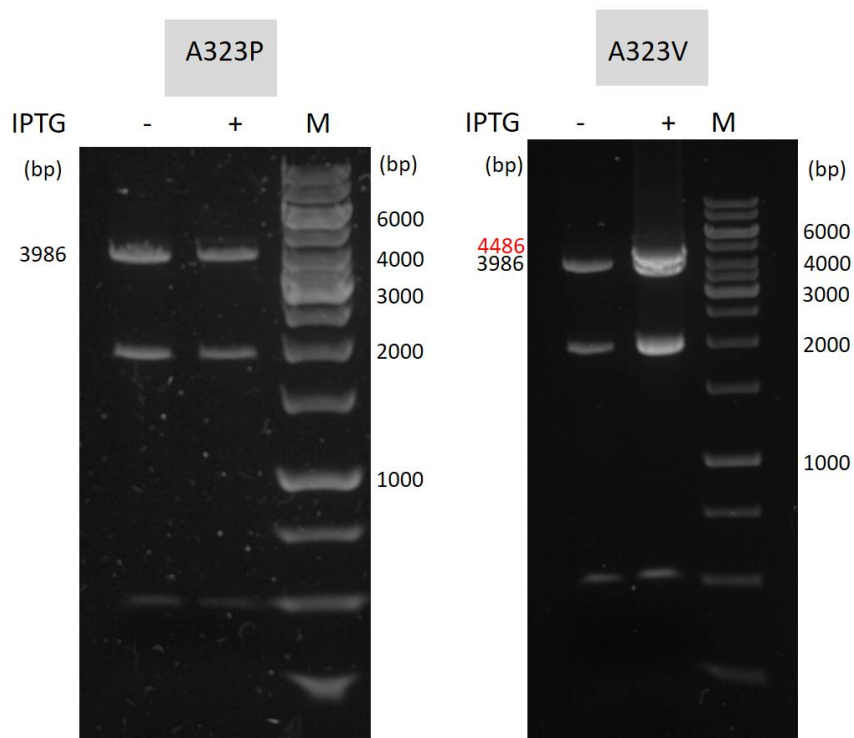
20. ábra: Az *M.MpeI*(Δ[T301-E305]) mutánst kódoló plazmid *Alw44I* emésztési képe.

Összefoglalva, az 1. felismerőhurokban létrehozott változtatások nem bizonyultak elegendőnek az enzim szekvenciaspecifitásának megváltoztatásához.

V.3.4. Mutációk a 2. felismerőhurokban

A 2. felismerőhurokban elhelyezkedő A323 a metilálандó citozint követő guanin (5'-CG-3') O6 atomjával létesít hidrogénhidat. A kölcsönhatás megzavarása szempontjából nehézséget jelentett, hogy ez esetben nem az oldallánc, hanem a peptidgerinc (-NH) vesz részt a hidrogénhíd kialakításában (17/C. ábra).

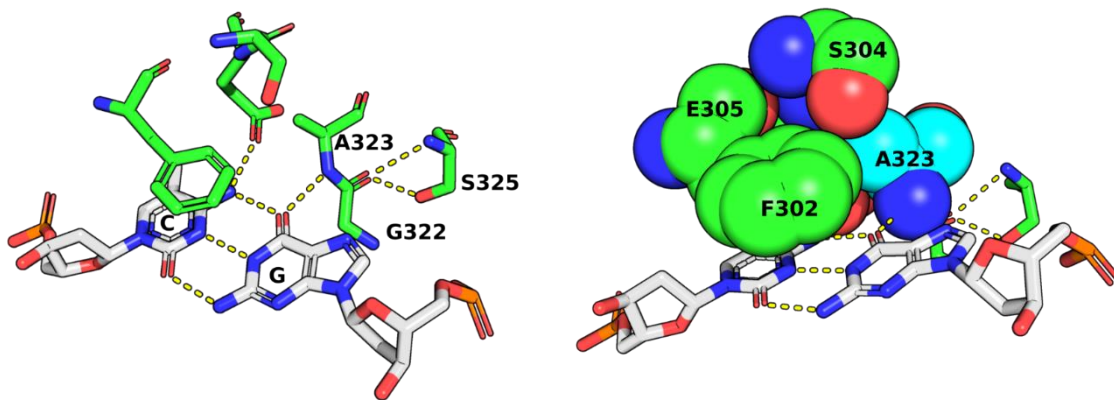
Először az A323P és az A323V mutánsokat készítettük el. Az *Alw44I* emésztések alapján az A323P változat inaktív volt, az A323V pedig gyenge CG specifikus MTáz aktivitással rendelkezett (21. ábra).



21. ábra: Az A323P és A323V mutánsokokat kódoló plazmidok Alw44I emésztési képe.

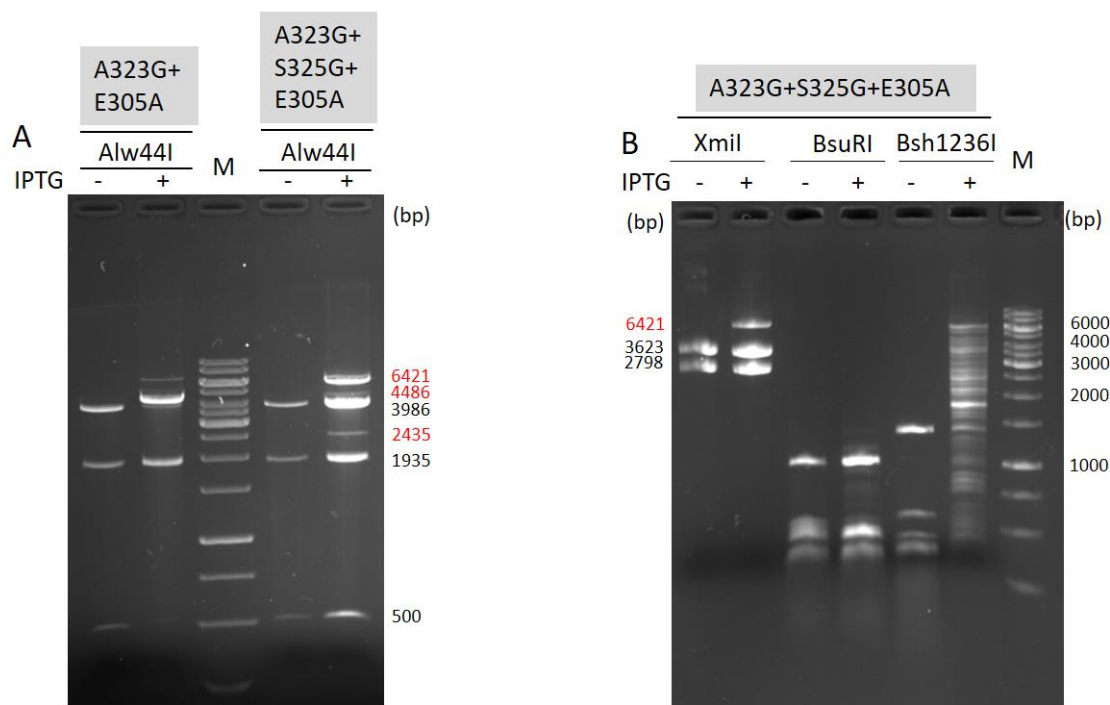
Az M.Mpel-DNS szerkezeti modell elemzése felfedte, hogy az A323 térbeli helyzetét – amely pont optimális a guaninnal történő hidrogénhíd kialakításához - alapvetően két kölcsönhatás tartja fenn (22. ábra).

1. Az A323 metilcsoportja szorosan illeszkedik egy „zsebbe” melyet az 1. felismerőhurokban elhelyezkedő F302, S304 and Q305 oldalláncai alakítanak ki
2. A S325 hidrogénhidakat létesít a G322 és az A323 közötti peptidkötéssel.



22. ábra: A CG felismerőhely guanin-O6 és az A323 közötti hidrogénhidat stabilizáló kölcsönhatások. Balra: Az S325 hidrogénhidakat létesít az G322-A323 közötti peptidkötés oxigénjével. Jobbra: Az A323 mozgását korlátozza az 1. felismerőhurok által kialakított „zseb”.

Feltételeztük, hogy ezen kölcsönhatások megszüntetésével destabilizálhatjuk a guanin O6-tal létesített hidrogénhidat, ami utat nyithat a szigorú CG-specifitás elrontásához. A hipotézis tesztelése céljából elkészítettük az A323G+E305A, S325G+E305A valamint az A323G+S325G+E305A mutánsokat. Az A323G helyettesítéssel eltávolítottuk az 1. felismerőhurok által alkotott zsebbe benyúló metilcsoportot. Az S325G mutáció pedig megszüntette a szerin oldallánc és a peptidkötés közötti hidrogénhidat. Mindhárom mutáns esetében az E305A cserét is beépítettük, hogy komplementer bázis (citozin) felismerését is megzavarjuk.



23. ábra: Az *M.Mpel*(A323G+E305A) és az *M.Mpel*(A323G+S325G+E305A) mutánsok szekvenszificitását vizsgálata. A: A *pET28-MMpel*(A323G+E305A) és a *pET28-MMpel*(A323G+S325G+E305A) plazmidok *Alw44I* emésztési képe. B: A *pET28-MMpel*(A323G+S325G+E305A) plazmid *XmiI*, *BsuRI* és *Bsh1236I* emésztése. Az emésztési mintázatok értelmezéséhez lásd a plazmidterképeket a 15. és 16. ábrán.

Az A323G+E305A mutáns esetében az *Alw44I*₃₄₇₈ hely teljesen védett az emésztéssel szemben, ami önmagában CG specifikus metilációra utal. A gélen ugyanakkor halványan megjelent a linearizált plazmid méretének megfelelő (6421 bp) fragmentum is, ami arra utal, hogy kis mértékben a többi *Alw44I* hely is metilálódhat (23/A. ábra). Ezen megfigyelések arra engednek következtetni, hogy bár a mutáns továbbra is elsősorban a CG dinukleotidokat metilálja, képessé vált, nagyon kis hatékonysággal, a CH helyekben elhelyezkedő citozinok módosítására is.

Az A323G+S325G+E305A hármas mutáns esetében a 6421 bázispáros védett fragmentum sokkal intenzívebben jelenik meg, mint a kettős mutánsnál, tehát erre a változatra erőteljesebb nem-kanonikus metiláció jellemző, mint a kettős mutánsra. Mivel az *Alw44I* emésztés alapján önmagában nehéz megítélni, hogy milyen arányban metilálódnak a CG és a nem-kanonikus CH helyek, más restriktációs enzimekkel (*XmiI*, *BsuRI*, *Bsh1236I*) is vizsgáltuk a plazmidokat (23/B. ábra).

Az indukált sejtekből izolált plazmid részlegesen védett volt az *XmiI* emésztéssel szemben: határozottan látszik egy 6421 bázispáros védett fragmentum, ami CA

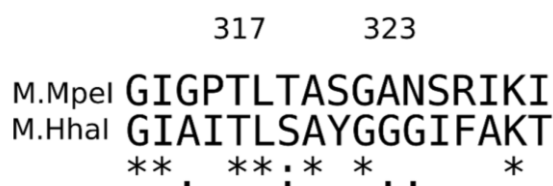
metilációra utal. A CC metiláció kimutatására szolgáló BsuRI emésztés esetében is látszódnak a védett fragmentumok, melyek meglehetősen halványak. Összeségében tehát a nem-kanonikus metiláció elsősorban a CA helyeken történik.

A CG metilációs aktivitás becslésére a Bsh1236I enzimet használtuk, amely a 5'-CGCG-3' szekvenciát ismeri fel és az emésztés gátolt, ha az aláhúzott citozinok legalább egyike metilált (Roberts és mtsai., 2023). A pET28-MMpel plazmidban 28 Bsh1236I hely található. Az emésztési kép alapján a A323G+S325G+E305A hármas mutáns jelentős aktivitással rendelkezik a kanonikus CG helyeken.

V.3.5. Deléciók a 2. felismerőhurokban

Egy korábbi tanulmányban (Gerasimaitė és mtsai., 2009) a HhaI metiltranszferáz olyan változatait állították elő, melyek felismerőhelye a vad típusú enzimre jellemző négyről (5'-GCGC-3') három nukleotidosra rövidült (5'-GCGN-3'). Lényegében, egy deléció beépítésével eltávolították a 2. felismerőhurok azon szakaszát, amely a 5'-GCGC-3' szekvencia 3' végi bázispárját (5'-GCGC-3'/5'-GCGC-3') ismeri fel.

Az M.HhaI és M.Mpel TRD-ben található 2. felismerőhurkok jelentős szekvenciahomológiát mutatnak (24. ábra), ami arra utal, hogy a két enzim legalább részben hasonló mechanizmussal ismeri fel a célszekvenciát. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy a (Gerasimaitė és mtsai., 2009) által alkalmazott stratégia segíthet az M.Mpel szekvenciaspecifitásának CG-ről CN-re rontásában is.



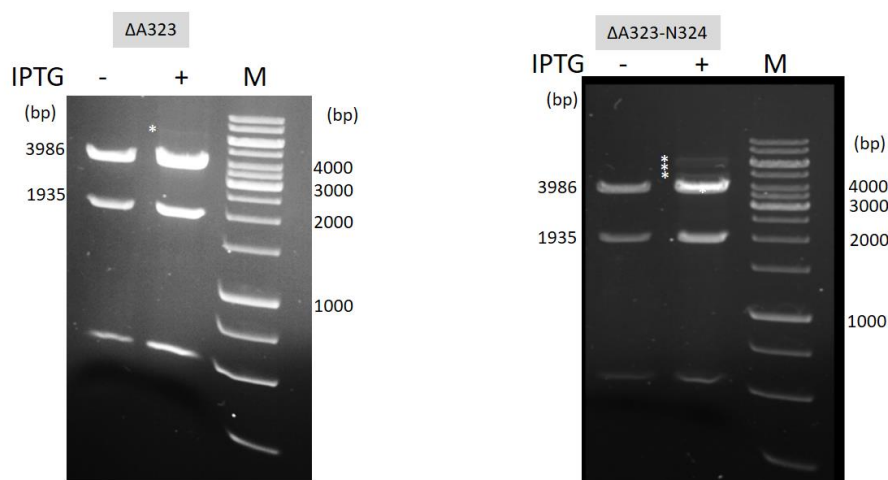
24. ábra: Az M.Mpel és M.HhaI TRD-ben található 2. felismerőhurkok aminosav-szekvenciaillesztése

Rövid deléciókat hoztunk létre az M.Mpel 2. felismerőhurok azon részében, amely a metilálendő citozint követő guaninnal létesít kölcsönhatásokat (25. ábra).

	317	323
WT	GIGPTLTASGANSRIKI	
$\Delta 322$	GIGPTLTAS - ANSRIKI	
$\Delta 323$	GIGPTLTASG - NSRIKI	
$\Delta 324$	GIGPTLTASGA - SRIKI	
$\Delta 323-324$	GIGPTLTASG - - SRIKI	
$\Delta 322-324$	GIGPTLTAS - - - SRIKI	

25. ábra: A deléciós *M.Mpel* változatok aminosav szekvenciája (2. felismerőhurok)

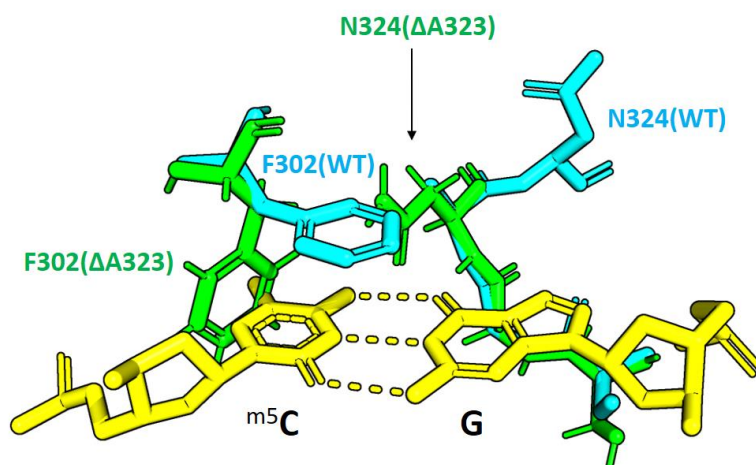
A mutánsokat kódoló plazmidok az Alw44I emésztési képen halványan megjelentek olyan védett fragmentumok, melyek nem-kanonikus metilációra utalnak (6421 bp, 5921 bp). A deléciós mutánsok közül a $\Delta[A323-N324]$ változat mutatta a legnagyobb aktivitást (26 ábra).



26. ábra: A deléciós mutánsok szekvenspecifitásának tesztelése. Balra: A pET28-MMpel $\Delta A323$ plazmid Alw44I emésztési képe. Jobbra: A pET28-MMpel $\Delta[A323-N324]$ plazmid Alw44I emésztési képe.

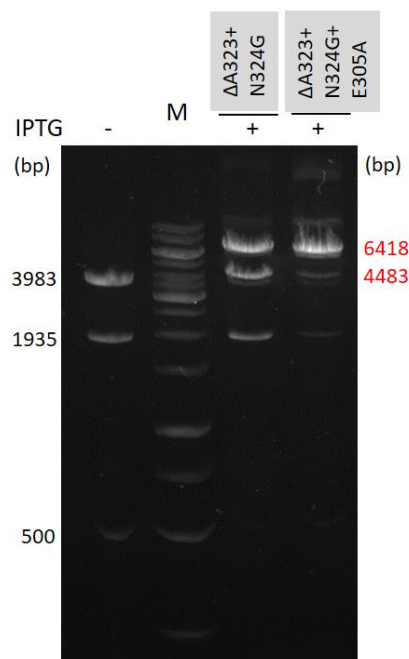
Meglepőnek találtuk, hogy a fenti, két aminosav deléciót tartalmazó mutáns nagyobb aktivitást mutatott, mint az egy aminosav deléciót tartalmazó $\Delta A323$, mivel a nagyobb deléciók általában a fehérje szerkezetének jelentősebb torzulásával járnak, ami hátrányosan befolyásolja az enzim katalitikus aktivitását. Mivel a $\Delta A323$ mindössze abban tér el a $\Delta[A323-N324]$ változattól, hogy az utóbbiban nincs jelen az N324 feltételeztük, hogy az aktivitáskülönbség oka az, hogy a $\Delta A323$ mutánsban az N324 viszonylag nagy térkitöltésű oldallánca szterikus konfliktusba kerülhet a fehérje többi részével. A hipotézis igazolására az I-Tasser szolgáltatás segítségével elkészítettük a $\Delta A323$ mutáns háromdimenziós szerkezeti modelljét. A prediktált atomi koordinátákat a

PyMol segítségével a vad típusú M.Mpel-DNS komplex röntgendiffrakciós szerkezetéhez illesztettük (27. ábra). Megfigyeltük, hogy a $\Delta A323$ mutáns modellje esetében az N324 oldallánca valóban jelentősen elmozdul az eredeti helyzetéhez képest és abba a térrészbe kerül ahol a vad típusú enzim esetében a F302 aromás oldallánca található.



27. ábra: Az A323 deléció által okozott feltételezett szerkezeti torzulás. A vad típusú M.Mpel (röntgendiffrakciós szerkezeti modell) és a $\Delta A323$ változat prediktált (I-TASSER) szerkezetének illesztése. Sárga: DNS, kék: vad típusú M.Mpel, zöld: $\Delta A323$ változat

A feltételezett szerkezeti torzulást megpróbáltuk úgy megszüntetni, hogy a $\Delta A323$ változatban a 324-es aszparagint glicinre cseréltük, létrehozva a $\Delta A323+N324G$ kettős mutánst.

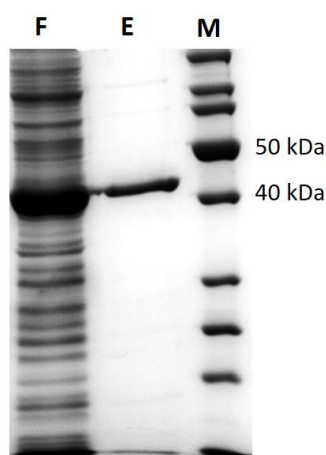


28. ábra: A *pET28-MMpel(ΔA323+N324G)* és a *pET28-MMpel(ΔA323+N324G+E305A)* plazmidok Alw44I emésztési képe.

A mutáns enzimet túltermelő plazmid Alw44I emésztési képen megjelent egy igen intenzív védett fragmentum, amely a teljes hosszúságú linearizált plazmidnak (6418 bp) felel meg (28. ábra). A védettség mértéke alapján az eddig elkészült mutánsok közül ez a változat rendelkezett a legnagyobb nem-kanonikus aktivitással.

A következő lépésben a $\Delta A323+N324G$ mutánsba beépítettük az E305A aminosavcserét is abból a célból, hogy a komplementer bázis (citozin) felismerését is megzavarjuk. Az így kapott $\Delta A323+N324G+E305A$ hármas mutáns CH specifikus metilációs aktivitása a kettős mutánshoz képest is tovább fokozódott. Az Alw44I emésztési képen a plazmid nagyrészt a teljes hosszúságú lineáris formában jelent meg (28. ábra).

Hogy részletesebb képet kapjunk a $\Delta A323+N324G+E305A$ szekvensspecifitásáról, a hármas mutánst affinitás kromatográfiával tisztítottuk, majd az így nyert preparátummal *in vitro* méréseket végeztünk kettősszálú oligonukleotid szubsztrátokkal. A fehérje termelődését, illetve a preparátum tisztaságát SDS-PAGE gélelektroforézissel ellenőriztük. A gélkép tanúsága szerint a fehérje kifejezetten nagy mennyiségben és oldható formában termelődött (29. ábra).



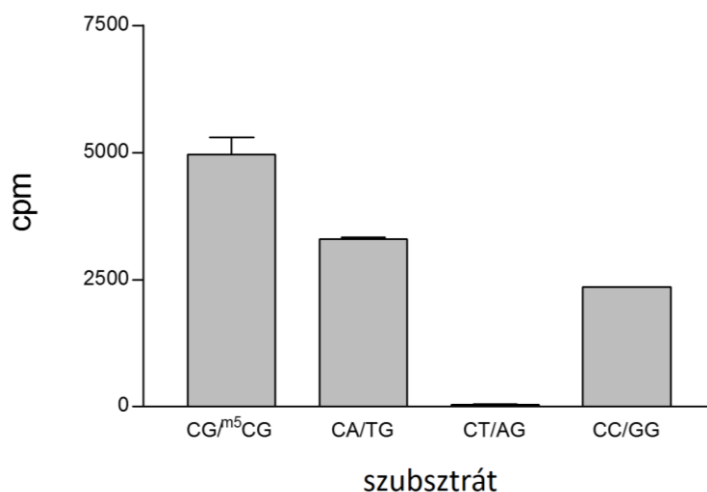
29. ábra: Az Mpel(Δ A323+N324G+E305A) mutáns tisztítása affinitás kromatográfiával, SDS-poliakrilamid gél. F: a sejtextraktum centrifugálása után nyert felülúszó, E: A His-Spin oszlopról eluált fehérje M: molekulásúly marker

Az enzim specifikitásának és aktivitásának jellemzése az **Anyagok és módszerek** fejezetben leírt trícium beépülésen alapuló módszerrel történt. A méréshez olyan duplaszálú oligonukleotidokat használtunk, melyek egyetlen CG, CA, CT, vagy CC szubsztráthelyet tartalmaztak (30. ábra). A CG dinukleotidot tartalmazó duplex esetében a szubsztráthely az egyik szálon metilált volt annak érdekében, hogy a szubsztrátkoncentráció mind a négy esetben azonos legyen. (A CH helyek csak az egyik szálon metilálódhatnak.)



30. ábra: Az *in vitro* MTáz aktivitás méréshez használt duplaszálú oligonukleotidok. A metilálható szubsztráthelyek piros színnel kiemelve.

A mérési eredmények igazolták az enzim relaxált szekvenszspecifitását: a CG helyek mellett a CA, és CC szubsztrátok esetében is kimutatható volt radioaktivitás-beépülés (31. ábra). Továbbra is a CG helyek voltak az enzim legjobb szubsztrátjai, második legjobb szubsztrát a CA, a harmadik a CC. Érdekes módon a CT dinukleotidok esetében nem lehetett kimutatni metilációt, tehát a hármás mutáns enzim nem egy teljesen aspecifikus C5-metiltranszferáz.



31. ábra: Az *M.Mpel*($\Delta A323+N324G+E305A$) mutáns aktivitása a CN dinukleotid szubsztrátokon.

V.4. Megváltozott szekvenszspecifitású *M.Mpel* változatok előállítása véletlenszerű mutagenézissel

V.4.1. Helyspecifikus random mutagenézis

A következő lépésben a $\Delta A323+N324G+E305A$ hármás mutánsban a 305. pozíciót telítési mutagenézissel vetettük alá, melytől azt reméltük, hogy izolálni tudunk olyan változatokat, melyekben a specifitás a CG felől a CA és/vagy CT és vagy CC helyek irányába tolódott.

A mutánsok inverz PCR-rel készültek az AK809 és AK810 oligonukleotidok felhasználásával. Az AK809 egy degenerált NNS (N= A, G, T vagy C; S = G vagy C) tripletet tartalmazott, amely biztosította a véletlenszerű mutációk beépülését a 305. pozícióba. A mutáns könyvtárat ScarabExpress T7 *lac* sejtekbe elektroporáltuk. A transzformánsok közül véletlenszerűen kiválasztottunk mintegy 60 klónt, melyek metilációs aktivitását és

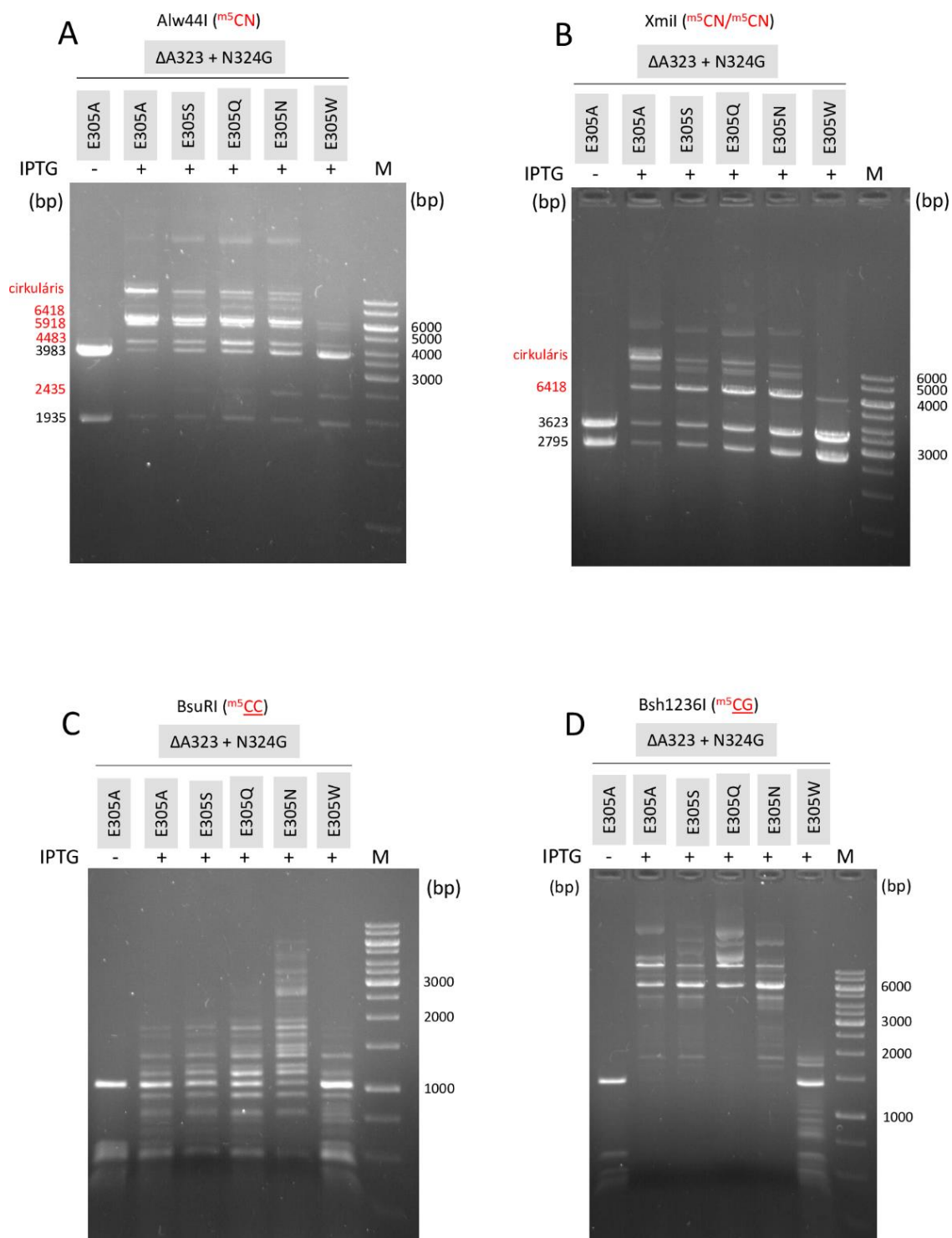
specifitását restrikciós védési teszttel (Alw44I) elemeztük. Olyan változatokat kerestünk, amelyekben a plazmidvédettségi mintázat eltér attól, amit a $\Delta A323+N324G+E305A$ esetében tapasztaltunk. Négy klónt választottunk ki részletesebb jellemzésre melyek, a szekvenálási eredmények alapján, az alábbi mutánsokat kódolták:

$\Delta A323+N324G+E305S$

$\Delta A323+N324G+E305Q$

$\Delta A323+N324G+E305N$

$\Delta A323+N324G+E305W$



32. ábra: A pET28-MMpel(ΔA323+N324G+E305X) plazmidváltozatok Alw44I, XmiI, BsuRI és Bsh1236I emésztési képe. Az emésztési mintázatok értelmezéséhez lásd a plazmidterképeket a 15 és 16. ábrákon. A gélek felett piros színnel látható, hogy milyen metiláció véd az adott enzimmel történő emésztéssel szemben.

Az indukált sejtekből izolált plazmidokat az Alw44I, XmiI, BsuRI, Bsh1236I enzimekkel emésztettük (32. ábra).

Az Alw44I emésztések alapján a $\Delta A323+N324G+E305S/Q/N$ mutánsok összaktivitása (CN) hasonló volt a $\Delta A323+N324G+E305A$ variánshoz, míg a $\Delta A323+N324G+E305W$ változat nagyon gyenge aktivitással rendelkezett.

Az XmiI emésztés gélképe a CA metilációs aktivitásról ad információt. A védett fragmentumok intenzitása alapján egyik mutáns sem metilálta hatékonyabban a CA helyeket, mint a $\Delta A323+N324G+E305A$. A CC metiláció által gátolt BsuRI emésztési képén viszont kiemelkedik a $\Delta A323+N324G+E305N$ változat, amely látványosan hatékonyabban metilálta a CC helyeket, mint a E305A mutáns. Azonban a $\Delta A323+N324G+E305N$, a Bsh1236I emésztés tanúsága szerint, továbbra is jelentős mértékű CG specifikus metilációra volt képes.

A mutánsok közül hármat ($\Delta A323+N324G+E305A/N/W$) affinitás kromatográfiával tisztítottunk és a szubsztrátpreferenciájukat a korábban ismertetett, tríciummal jelölt metilcsoport beépülésén alapuló módszerrel vizsgáltuk. A mérési eredmények (többnyire) megerősítették a plazmidvédeltségi tesztekben levont következtetéseket (5. táblázat).

szubsztrát	+305A	+305N	+305W
AK702-AK703 (5'-CG/5'- ^{m5} CG)	4961	940	307
AK704-AK705 (5'-CA/5'-TG)	3289	417	0
AK706-AK707 (5'-CT/5'-AG)	0	0	0
AK708-AK709 (5'-CC/5'-GG)	2351	429	0

5. táblázat: Az egyes oligonukleotid szubsztrátokba beépült radioaktivitás (cpm). Két független mérés átlaga.

A $\Delta A323+N324G+E305W$ mutáns nagyon gyenge CG specifikus aktivitást mutatott, a CH szubsztrátok esetében pedig nem tapasztaltunk radioaktivitás-beépülést. A $\Delta A323+N324G+E305A$ és a $\Delta A323+N324G+E305N$ változatok a CA és CC helyeket is metilálták, ugyanakkor mindkét esetben továbbra is a CG dinukleotidok maradtak a legjobb szubsztrátok. Egyik mutáns esetében sem volt kimutatható aktivitás a CT helyeken.

Különösnek találtuk, hogy a $\Delta A323+N324G+E305N$ esetében kevesebb radioaktivitás épült be a CC dinukleotidot tartalmazó szubsztrátba, mint a $\Delta A323+N324G+E305A$ változatnál, mivel ez ellentmondott a BsuRI emésztés eredményének (32/C. ábra). Ezt az ellentmondást csak a munka egy későbbi szakaszában tudtuk feloldani (lásd V.5.1 alfejezet).

V.4.2. A 2. felismerőhurok két rövid szakaszának random mutagenizálása

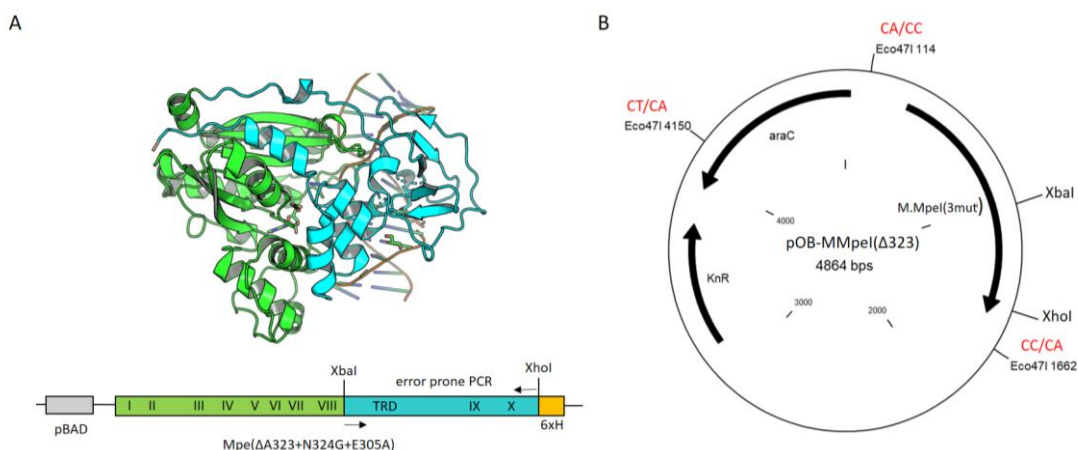
A munka további részében a véletlenszerű mutagenezist és szelekciót magába foglaló irányított evolúciós megközelítéssel próbáltuk a $\Delta A323+N324G+E305A$ variáns szubsztrátpreferenciáját a CH dinukleotidok felé tolni.

Az első próbálkozás során inverz PCR-rel random mutációkat építettünk be a pET28Mpe($\Delta A323+N324G+E305A$) plazmidban található hármas mutánst kódoló gén azon szakaszába, mely a 2. felismerőhurkot kódolja. A mutagenézis degenerált tripleteket (NNS) tartalmazó oligonukleotidok felhasználásával történt a IV.12 alfejezetben ismertetett módon és a 320-322, illetve a 324 -326 szakaszokat érintette.

A ligálás során keletkezett plazmidkönyvtárat ScarabExpress T7 *lac* sejtekbe transzformáltuk és a kapott telepeket összemostuk. A szuszpenzióból 200 μ l-t átoltottunk 100 ml LB tápoldatba. Az öt órán át indukált (IPTG) kultúrából plazmidot izoláltunk és 500 ng plazmid DNS-t Alw44I enzimmel emésztettük. Az emésztett DNS-ből vett mintával ScarabExpress T7 *lac* sejteket transzformáltunk. A kapott klónokat a metilációra érzékeny restrikciós enzimekkel teszteltük. Sajnos nem sikerült olyan mutánst találnunk, amely hatékonyabban metilálja CH helyeket, mint a $\Delta A323+N324G+E305A$ hármas mutáns.

V.4.3. „Error-prone” PCR mutagenézis

A következő kísérlet során $\Delta A323+N324G+E305A$ hármas mutánst kódoló gén egy hosszabb szakaszát vetettük alá mutagenézisnek a Taq DNS polimeráz felhasználásával. A reakciókörülmények részletes leírása az **Anyagok és Módszerek** fejezetben található (IV.13). A mutagenizált rész a gén XbaI és XhoI restrikciós helyek által határolt ~460 bázispár hosszúságú szakasza volt, amely az enzim kis doménjét és benne a szekvenciaspecifitásért felelős TRD régiót kódolja (33. ábra).



33. ábra: Irányított evolúciós kísérlet az $Mpe(\Delta A323+N324G+E305A)$ hármas mutáns metilációs preferenciájának megváltoztatására. A: Az enzím C-terminális felének EP-PCR alapú mutagenézise. A fehérje mutagenizált részét kék szín jelöli. B: Az $XbaI/XhoI$ emésztett PCR fragmentumokat a $pOB-MMpe(\Delta A323)$ plazmidba klónoztuk be. A plazmid térképen láthatóak a szelekcióra használt $Eco47I$ helyek. Az egyes hasítóhelyeknél a piros színnel jelölt dinukleotid-metiláció gátolja az emésztést.

A tisztított PCR terméket $XbaI$ és $XhoI$ restrikciós enzimekkel emésztettük, majd a fragmentumot a $pOB-MMpe(\Delta A323)$ plazmid $XbaI$ és $XhoI$ helyei közé klónozzuk be.

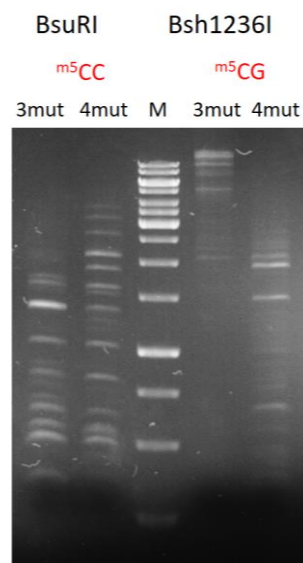
A tisztított ligátumot *ScarabExpress* sejtekbe elektroporáltuk. A mutációs gyakoriság meghatározása céljából hat véletlenszerűen kiválasztott transzformánsból plazmidot izoláltunk és meghatároztuk a metiltranszferáz kódoló gén szekvenciáját. A mintában egy gén átlagosan 2,5 mutációt tartalmazott, melyek 80%-a A → G tranzíció volt.

A megváltozott specifitású MTáz változatok szelektálásához a telepeket (összesen ~60 000 klón) összemosztuk, majd a szuszpenzióból 1 ml-t 100 ml kanamicint tartalmazó LB folyadéktáptalatra oltottunk át. A sejteket 37 °C-on növesztettük addig, amíg a kultúra 600 nm-en mért optikai denzitása el nem érte a 0,6 –os értéket. Ekkor 1 ml 10% L-arabinóz hozzáadásával indukáltuk az *araBAD* promoterről történő fehérjekifejeződést. Az indukálószer hozzáadását követően a sejteket 30 °C-on növesztettük 5 órán át. Ezt követően a tenyészetből plazmid DNS-t izoláltunk. A CH helyeket metiláló változatok szelektálása céljából 500 ng plazmidot 20 egység $Eco47I$ restrikciós endonukleázzal emésztettünk 20 μL végtérfogatban. Az $Eco47I$ a 5'-GGWCC szekvenciákat ismeri fel és nem hasít, ha a felismerőhely 3' végén található citozin akár

csak az egyik szálon is metilált (Roberts és mtsai., 2023). A metiltranszferáz változatokat kifejező pOK-BAD alapú plazmidban három Eco47I felismerőhely található olyan szekvenciakörnyezetben, ahol a 3' végi citozint két esetben C és A (114. és 1662.), illetve egy esetben C és T (4150.) követi (33/B. ábra). Ezek együttesen lehetővé teszik a CH metilációra való szelektálást.

A emésztési elegyből 5 µL-t kémiaiilag kompetens ER1821 sejtekbe transzformáltunk. A transzformánsokat egyenként LB tápoldatba oltottuk és arabinóz hozzáadásával indukáltuk az *araBAD* promoterről történő fehérjekifejeződést. A sejt kultúrákból izolált plazmidok metiláltsági állapotát Eco47I (CH metilációra érzékeny), BsuRI (CC metilációra érzékeny), és Bsh1236I (CG metilációra érzékeny) emésztéssel vizsgáltuk.

Egy klónt találtunk, amely az emésztési kép alapján a CC helyeken nagyobb, a CG helyeken pedig kisebb aktivitást mutatott, mint a random mutagenézis templátjaként szolgáló M.Mpel($\Delta A323+N324G+E305A$) hármas mutáns (34. ábra).

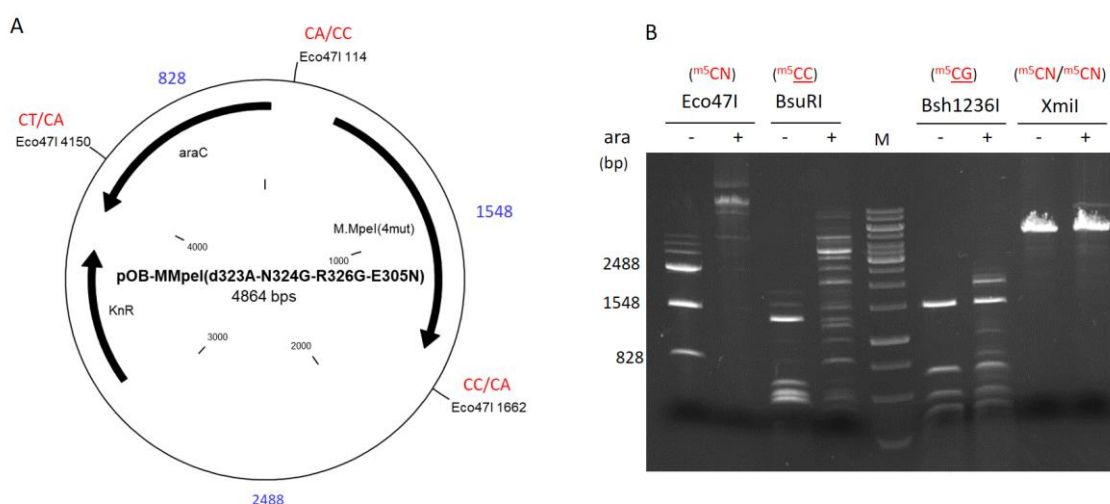


34. ábra: A $\Delta A323+N324G+E305A$ variáns (az ábrán 3mut) és az irányított evolúciós kísérlet eredményeként nyert mutáns $\Delta A323+N324G+R326G+E305A$ (az ábrán 4mut), szekvenciaspecifitásának összehasonlítása. Mindkét mutáns a pOB plazmidba volt beépítve. Az 5 órán át indukált sejtekből izolált plazmidokat BsuRI és Bsh1236I emésztéssel vizsgáltuk. Az enzimek nevei alatt piros színnel látható az emésztés ellen védő metiláció-specifitás.

A plazmidban található metiltranszferáz gén szekvenálása két új pontmutációt fedett fel, melyek közül az egyik csendes mutáció volt, a másik pedig az R326G cseréhez

vezetett. A plazmidot, amely a négyes mutáns M.Mpel változatot kódolja pOB-M.Mpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305A$)-nak neveztük el.

Az V.4.1. alfejezetben leírt munka során megfigyeltük, hogy az M.Mpel($\Delta A323+N324G+E305A$) hármas mutáns CC metilációs aktivitása fokozódik, ha a 305-ös alanint aszparaginra cseréljük. Sajnos ez a mutáns (M.Mpel($\Delta A323+N324G+E305N$)) továbbra is jelentős CG specifikus aktivitással rendelkezett. Az E305N cserét beépítettük az M.Mpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305A$) négyes mutánsba, reménykedve abban, hogy a mutáns CC specifikus aktivitása tovább fokozódik és a CG specifikus metiláció továbbra is alacsony szintű marad. A létrehozott plazmid neve: pOB-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$).



35. ábra: Az M.Mpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) négyes mutáns szekvenspecifitásának vizsgálata. A: A pOB-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) plazmid térképe az Eco47I hasítóhelyekkel. A kék számok a teljes emésztés során keletkező DNS-fragmentumok méreteit jelölik. B: A pOB-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) plazmid emésztése metilációra érzékeny restriktív endonukleázokkal. +: arabinózzal indukált sejtekből tisztított plazmidok, -: indukálatlan sejtekből izolált plazmidok. Az enzimek nevei felett piros színnel látható az adott enzimmel tesztelhető metiláció specifitás.

Az öt órán át indukált kultúrákból izolált pOB-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) plazmidot Eco47I, BsuRI, Bsh1236I, és XmiI enzimekkel emésztettük (35/B. ábra). A $\Delta A323+N324G+R326G+E305N$ mutáns nagyobb védettséget mutatott a BsuRI emésztéssel szemben, mint a

$\Delta A323+N324G+R326G+E305A$ változat (36. ábra). A CG metilációra érzékeny Bsh1236I enzimmel szembeni védettség továbbra is alacsony maradt.

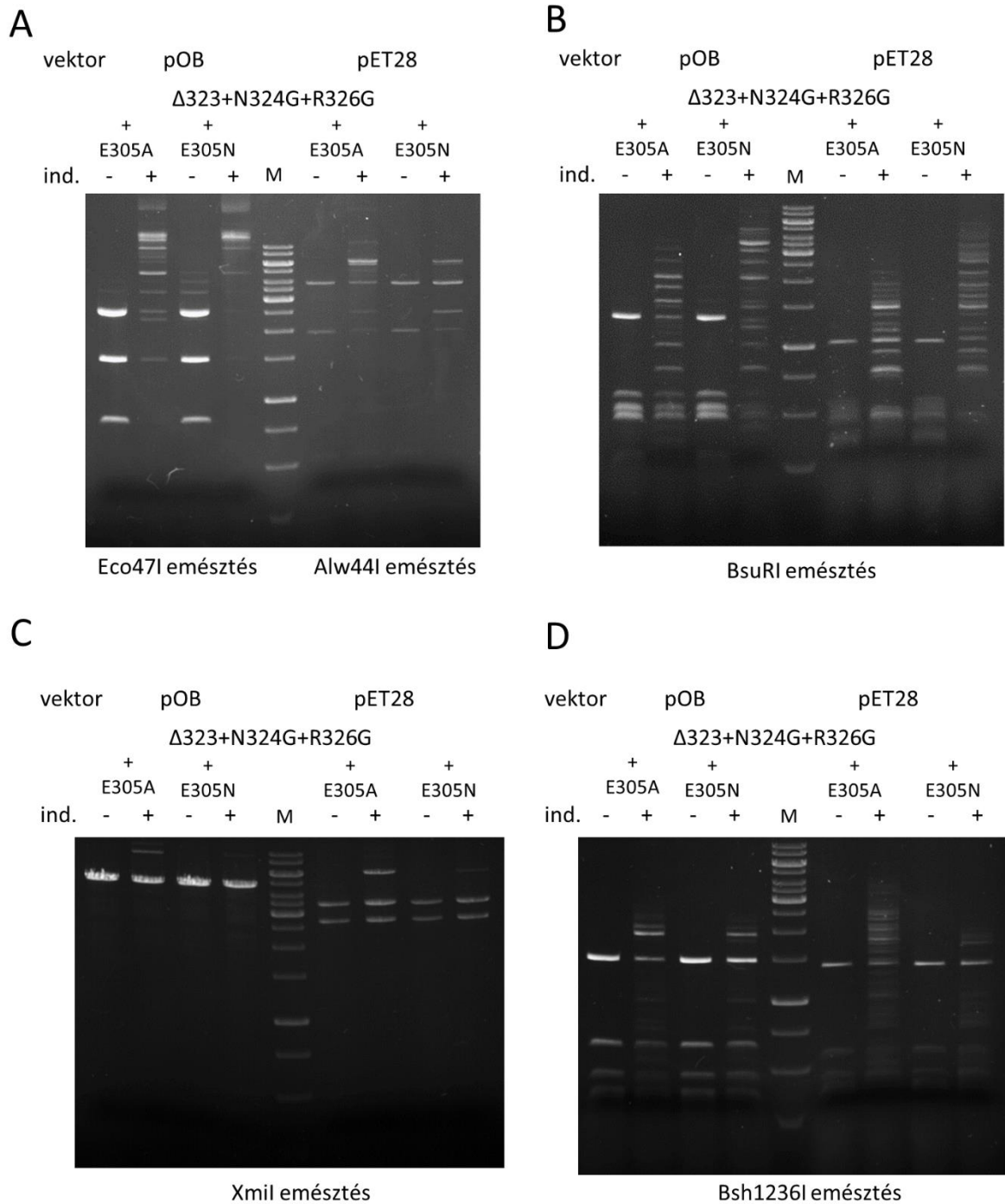
A pOB-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) plazmid egyetlen XmiI felismerőhelyet tartalmaz melynek 3' végeit mindkét szálon adeninek szegélyezik, tehát a hely emészthetősége a CA specifikus metilációról ad felvilágosítást. A gélkép tanúsága szerint a plazmidban található XmiI hely csaknem teljesen megemésztődik, tehát a mutáns nagyon gyenge aktivitással rendelkezik a CA dinukleotidok esetében. Összeségében, az emésztési képek arra utalnak, hogy a $\Delta A323+N324G+R326G+E305N$ négyes mutáns egy olyan DNS MTáz, amely erős preferenciát mutat a CC dinukleotidok iránt.

Meglepőnek találtuk, hogy az indukált sejtekből izolált plazmid nagyrészt cirkuláris formában maradt meg az Eco47I emésztést követően (35/B. ábra), mivel a három Eco47I hely közül csak kettő esetében (a plazmid térképen a 114, 1662 pozíciók) hoz létre a felismerőhely 3' végi citozinja és a downstream nukleotid CC motívumot (35/A ábra). A harmadik Eco47I hely (4150) 3' végi nukleotidjait egy adenin, illetve egy timin szegélyezi, tehát – mivel az XmiI emésztés alapján a CA és/vagy CT helyek csak elhanyagolható mértékben metilálódnak - a gélen az Eco47I emésztett plazmidnak elsősorban linearizált formában kellett volna megjelennie. Az ellentmondásra magyarázattal szolgál, hogy az Eco47I felismerőhely belső citozinjának metilációja (GGWCC) is gátolja az emésztést (Tímár és mtsai., 2004). Ebből következik, hogy a CC metiláció mindhárom felismerőhelyet meg tudja védeni a hasítással szemben.

A korábbi mutánsokkal (melyek a pET28 plazmidban készültek) való összehasonlítás érdekében átépítettük a $\Delta A323+N324G+R326G+E305A$ és a $\Delta A323+N324G+R326G+E305N$ mutánsokat kódoló géneket a pET28 alapú plazmidba. Az így létrehozott pET28-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305A$), illetve pET28-MMpel($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) plazmiddal is elvégeztük a védési teszteket (36. ábra), melyek megerősítették a korábbi eredményeket:

- 1) Mindkét változat elsősorban a CC dinukleotidokat metilálja. Az E305N mutáció beépítése fokozta a CC helyek metilációját (BsuRI emésztés).
- 2) A CG dinukleotidok metilációjának hatékonysága alacsony, különösen az E305N mutáns esetében (Bsh1236I emésztés).

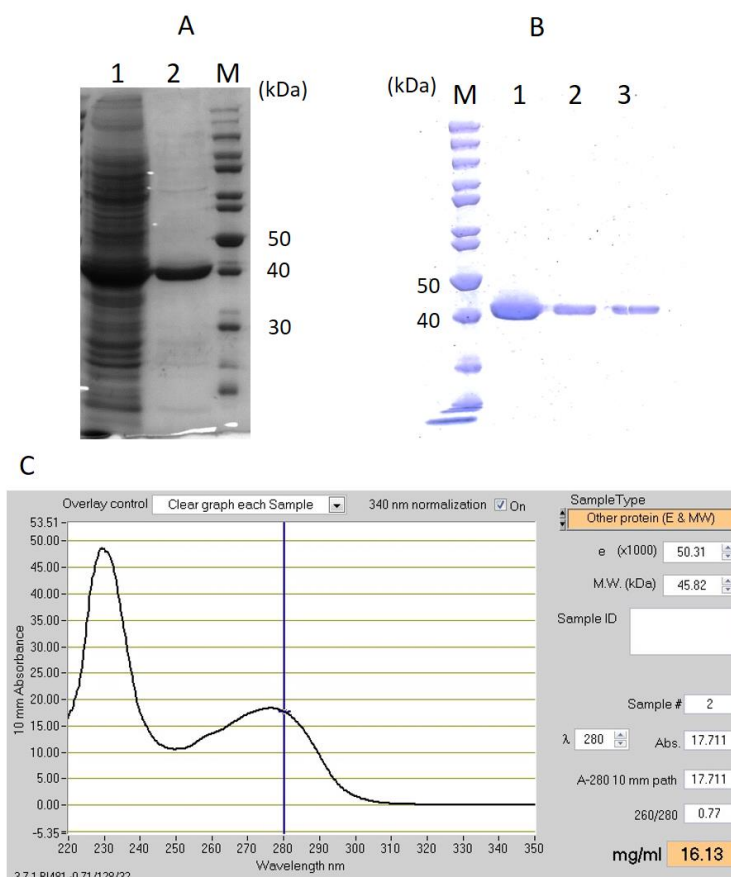
3) A mutánsok CA és CT specifikus aktivitása gyenge, vagy hiányzik (Xmil emésztés).



36. ábra: Az *M.Mpel*($\Delta A323+N324G+R326G+E305A$) és a *M.Mpel*($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) négyes mutánsok szekvenspecifikitásának vizsgálata. A mutánsokat eredetileg a pOK-BAD vektorban hoztuk létre, majd átklónoztuk a pET28 vektorba. Mindkét változatot az ábrán látható metilációra érzékeny restrikciós enzimekkel emésztettük. M: GeneRuler 1 kb DNA ladder.

V.5. A M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) négyes mutáns tisztítása és jellemzése *in vitro* mérésekkel

A M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) négyes mutáns tisztítása az **Anyagok és módszerek** fejezetben ismertetett módon affinitás kromatográfiával, a His-Spin Protein Miniprep kit, illetve a His-Select Ni-agaróz oszlop használatával történt.



37. ábra: Az M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) mutáns tisztítása.

A: A His-Spin oszloppal tisztított fehérje ellenőrzése SDS-PAGE gélen. 1: felülcsúzó, 2: tisztított fehérje, M: PageRuler Unstained Protein Ladder.

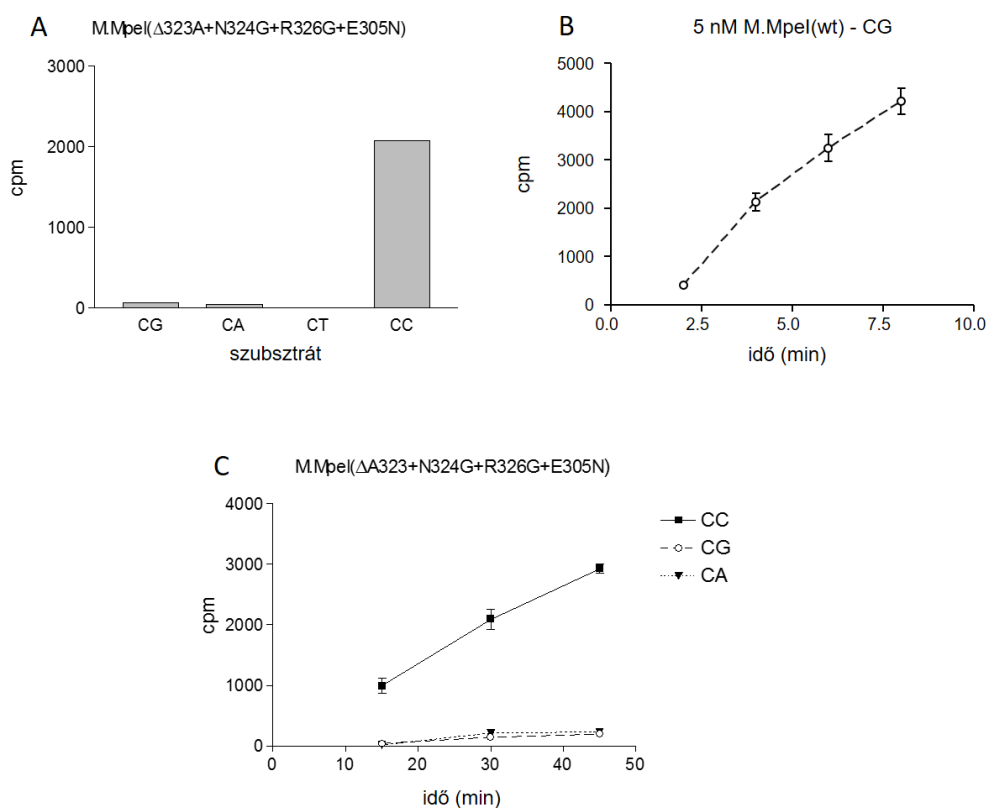
B: A His-Select Nickel oszloppal tisztított fehérje. 1: 2 μ L a 10x hígított enzimből, 2: 2 μ L a 66x hígított enzimből, 3: 2 μ L 5x hígított His-Spin preparátum.

C: A His-Select Nickel oszloppal tisztított enzim koncentrációjának meghatározása NanoDrop spektrofotométerrel.

A preparátumok tisztaságát SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük (37. ábra). A tisztított enzim szubsztrátpreferenciáját a korábban már ismertetett radioaktív metilcsoport beépülésén alapuló módszerrel határoztuk meg. A mérések során használt duplaszálú oligonukleotidok CG/^m5CG, CA/TG, CC/GG, illetve a CT/AG

szubsztráthelyeket tartalmaztak. Az oligoduplexek teljes szekvenciáját a 30. ábra tartalmazza.

A mérési eredménynek (38. ábra) megerősítették a védési tesztek alapján levont következtetést: a mutáns enzim elsősorban CC dinukleotidokat metilál. Az enzim nagyon gyenge hatékonysággal metilálta a CG és CA helyeket. A CT dinukleotidok esetében nem tudtunk metilációt kimutatni (38/A. ábra).



38. ábra: Az *M.Mpel*(Δ A323+N324G+R326G+E305N) mutáns szekvenspecifitásának vizsgálata *in vitro* duplaszálú oligonukleotidok (AK703-709) és [metil- 3 H]-SAM] felhasználásával. A: A dinukleotid szubsztráthelyekbe 30 perc alatt beépült radioaktivitás. Két független mérés átlaga.

B és C: A CG, CA és CC szubsztrátokba beépült radioaktivitás az idő függvényében. Vad típusú *M.Mpel* (B) és *M.Mpel*(Δ A323+N324G+R326G+E305N) mutáns (C). Három független mérés átlaga.

Az egyik kísérlet során az idő függvényében mértük a radioaktív metilcsoport beépülését a négy különböző szubsztrát esetében (38/C. ábra). A reakciót a tisztított metiltranszferáz hozzáadásával (350 nM végkoncentráció) indítottuk el, majd 15, 30, illetve 45 perc elteltével mintát vettünk a reakcióelegyből és 4 μ L 10 %-os SDS

hozzáadásával inaktiváltuk az enzimet. Az egyes szubsztrátokra vonatkozó reakciósebesség a 6. táblázatban látható. A négyes mutáns ~ 10-szer gyorsabban metilálja a CC szubsztrátot mint a kanonikus CG dinukleotidot.

szubsztrát dinukleotid	metiláció ráta (CPM/min)
CC	73,4
CG	7,6
CA	12,9
CT	0

6. táblázat: Az *M.Mpel*($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) mutáns által katalizált metiláció sebessége a négy szubsztrát esetében.

A vad típusú *M.Mpel* CG dinukleotidokon mutatott aktivitásának méréséhez (38/B. ábra) a hemimetilált CG helyet tartalmazó AK702-703 oligonukleotid duplexet használtuk. Az enzim nagy aktivitása miatt az időfüggés mérésekhez a tisztított vad típusú *M.Mpel*-et 5 nM végkoncentrációban adtuk a reakcióhoz és 2, 4, 6, 8 perc reakciót követően mértük meg a beépült radioaktivitást.

A négyes mutáns CC szubsztráton mutatott fajlagos aktivitása (0,2 cpm/min/nM) közelítőleg 530-szor kisebb, mint a WT-*M.Mpel* CG dinukleotidokon mutatott aktivitása (106 cpm/min/nM).

V.5.1. A határoló nukleotidok hatása a CC metiláció hatékonyságára

Az eukarióta Dnmt3a és Dnmt3b enzimek esetében kimutatták, hogy a CG motívumokat határoló nukleotidok jelentősen befolyásolják az adott hely metilációjának hatékonyságát (Handa & Jeltsch, 2005; Mallona és mtsai., 2021). Kíváncsiak voltunk arra, hogy az általunk létrehozott CC specifikus mutáns enzim (*M.Mpel*($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$)) esetében a CC szubsztráthely szekvenciakörnyezetének van-e hatása a metilációra.

A mérésekhez a radioaktívan jelölt metilcsoport beépülésén alapuló módszert használtuk. A kísérleteket olyan duplaszálú oligonukleotidokkal végeztük, melyek a CC szubsztráthelyet határoló nukleotidokban különböztek. Az összes variáció (4*4)

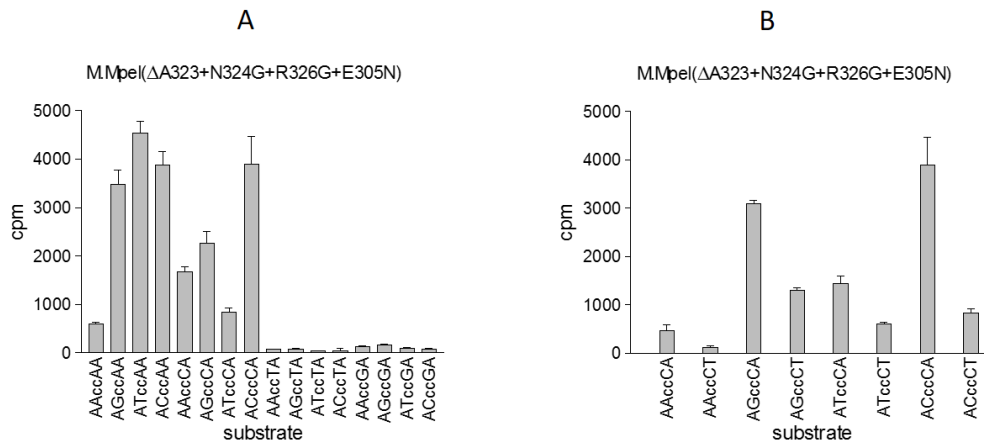
teszteléséhez 16 oligoduplexre volt szükség, melyek teljes szekvenciája az 7. táblázatban látható.

Szubsztráthely négy határoló nukleotiddal	Oligonukleotidok	Az oligonukleotid duplex szekvenciája
AACgAA	AK702 – AK703	GAATTATAAAAA CG AAAATAAAAC CTTAATATTTTGCTTTTATTTTG
AACcAA	AK708 – AK709	GAATTATAAAAA CC AAAATAAAAC CTTAATATTTTGTTTATTTTG
AGccAA	AK921 - AK922	GAATTATAAAG CC AAAATAAAAC CTTAATATTTTCGGTTTATTTTG
ATccAA	AK923 - AK924	GAATTATAAAT CC AAAATAAAAC CTTAATATTTAGGTTTATTTTG
ACccAA	AK925 - AK926	GAATTATAAAC CC AAAATAAAAC CTTAATATTTGGGTTTATTTTG
AACcCA	AK931 - AK932	GAATTATAAAAA CC CAAATAAAAC CTTAATATTTTGGGTTTATTTTG
AGccCA	AK969 - AK970	GAATTATAAAG CC CAAATAAAAC CTTAATATTTTCGGTTTATTTTG
ATccCA	AK975 - AK976	GAATTATAAAT CC CAAATAAAAC CTTAATATTTAGGTTTATTTTG
ACccCA	AK983 - AK984	GAATTATAAAC CC CAAATAAAAC CTTAATATTTGGGTTTATTTTG
AACcTA	AK927 - AK928	GAATTATAAAAA CC TAAATAAAAC CTTAATATTTTGGATTTATTTTG
AGccTA	AK967 - AK968	GAATTATAAAG CC TAAATAAAAC CTTAATATTTTCGGATTTATTTTG
ATccTA	AK977 - AK978	GAATTATAAAT CC TAAATAAAAC CTTAATATTTAGGATTTATTTTG
ACccTA	AK981 - AK982	GAATTATAAAC CC TAAATAAAAC CTTAATATTTGGGATTTATTTTG
AACcGA	AK929 - AK930	GAATTATAAAAA CC GAAATAAAAC CTTAATATTTTGGCTTTATTTTG
AGccGA	AK971 - AK972	GAATTATAAAG CC GAAATAAAAC CTTAATATTTTCGGCTTTATTTTG

ATccGA	AK973 - AK974	GAATTATAAAAT CC GAAATAAAAC CTTAATATTTAGGCTTTATTTTG
ACccGA	AK979 - AK980	GAATTATAAAC CC GAAATAAAAC CTTAATATTTGGGCTTTATTTTG
AAccCT	AK987 – AK988	GAATTATAAAA CC CTAATAAAAC CTTAATATTTTGGGATTATTTTG
AGccCT	AK989 – AK990	GAATTATAAAG CC CTAATAAAAC CTTAATATTTTCGGGATTATTTTG
ATccCT	AK991 –AK992	GAATTATAAAAT CC CTAATAAAAC CTTAATATTTAGGGATTATTTTG
ACccCT	AK993 – AK994	GAATTATAAAC CC CTAATAAAAC CTTAATATTTGGGATTATTTTG
AAcgCA	AK1008 – AK1009	GAATTATAAAA CG CAAATAAAAC CTTAATATTTTGCGTTTATTTTG
AAcgGA	AK1010 - AK1011	GAATTATAAAA CG GAAATAAAAC CTTAATATTTTGCCTTTATTTTG
AAcgTA	AK1012 - AK1013	GAATTATAAAA CG TAAATAAAAC CTTAATATTTTGCA ¹ TTTATTTTG

7. táblázat: A CC szubsztráthelyet határoló nukleotidok hatásának vizsgálatára használt oligoduplexek.

A reakció során a tisztított metiltranszferázt 30 percig inkubáltuk az oligoduplexek jelenlétében. A mérési eredmények alapján a CC helyet határoló nukleotidok jelentősen befolyásolták a metiláció hatékonyságát (39. ábra). A legjobb (ATccAA) és a legrosszabb szubsztrát (ATccTA) között mintegy 150-szeres különbséget mértünk a beépült radioaktivásban.



39. ábra: A CC helyeket határoló nukleotidok hatása a metiláció hatékonyságára. Három független mérés átlaga. A: A 16 lehetséges határolónukleotid-variáció hatása. B: Az ANccCA és ANccCT helyek metilálhatóságának összehasonlítása.

Azon CC helyek, melyeket 3' irányban T vagy G nukleotidok szegélyezik sokkal rosszabb hatékonysággal metilálódtak, mint az ezen pozícióban A-t vagy C-t tartalmazó oligók.

A 3' oldalon citozint tartalmazó szubsztrátok (AAccCA, AGccCA, ATccCA, ACccCA) esetében az eredménynek értelmezését megnehezítette, hogy a ccC mellett ccA (ANccCA) szubsztráthelyet is tartalmaztak, ezért a méréseket olyan szubsztrátokkal is elvégeztük, melyekben a ccC helyet T követi A helyett (ANccCT, AK987-AK994). (A ccT helyek gyenge szubsztrátok.) A 39/B ábrán látható, hogy a ANccCT szubsztrátok is metilálhatóak, igaz kisebb hatékonysággal, mint a ANccCA változatok. Összességében elmondható, hogy az enzim azokat a szubsztrátokat részesíti előnyben, melyekben a CC helyet A, vagy C követi.

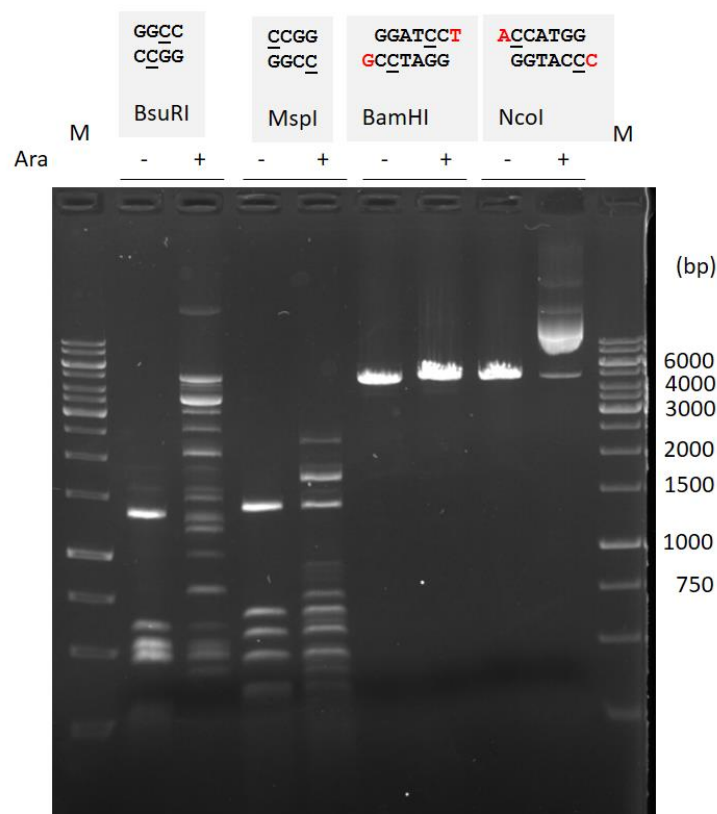
Az 5' oldali határoló nukleotid hatása kevésbé jelentős, mint a 3' határoló nukleotidé, a legtöbb változat hatékonyan metilálható (39/A. ábra). Ebben a pozícióban az A jelenléte a legkedvezőtlenebb a metiláció hatékonysága szempontjából.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a négyes mutáns 3' oldali határoló nukleotid preferenciája kimutatható-e *in vivo* is. A pOB-MmpI(Δ A323+N324G+R326G+E305N) plazmidot ER1821 sejtekbe transzformáltuk. Az indukálatlan, illetve 5 órán át indukált (0,1 % arabinóz) sejtekből plazmid DNS-t izoláltunk, melyet BsuRI (GGCC), MspI(CCGG), BamHI (GGATCC) and NcoI (CCATGG) restrikciós endonukleázokkal emésztettünk. Mind a négy enzim esetében a felismerőhely átfed egy CC dinukleotiddal és az aláhúzott citozin

metilációja gátolja az emésztést, akkor is, ha csak az egyik szál metilálódik (Roberts és mtsai., 2023).

Az 40. ábrán látható, hogy az indukált kultúrából izolált plazmid nagyobb fokú védettséget mutatott a BsuRI emésztéssel szemben, mint az MspI emésztéssel szemben. Ez összhangban van az *in vitro* mérési eredményekkel, mivel a plazmidban található 13 BsuRI hely közül mindössze egy van, amelynek 3' végét nem A vagy C határolja legalább az egyik szálon. (A CCa és CCc motívumok *in vitro* jó szubsztrátok.) Ugyanakkor az MspI helyben található CC motívumot minden esetben G követi 3' irányban.

Az indukált minta esetében a plazmidban található egyetlen BamHI hely teljesen megemésztődött. Az eredmény nem meglepő, mivel a BamHI helyben található CC dinukleotidot 3' irányban T, illetve G határolja. Ezzel szemben a plazmidban szintén egyedi NcoI hely csaknem teljesen ellenállt az emésztésnek, amire magyarázattal szolgál az, hogy a felismerőhelyben található CC motívumot 3' irányban adenin követi DNS mindkét szálán.

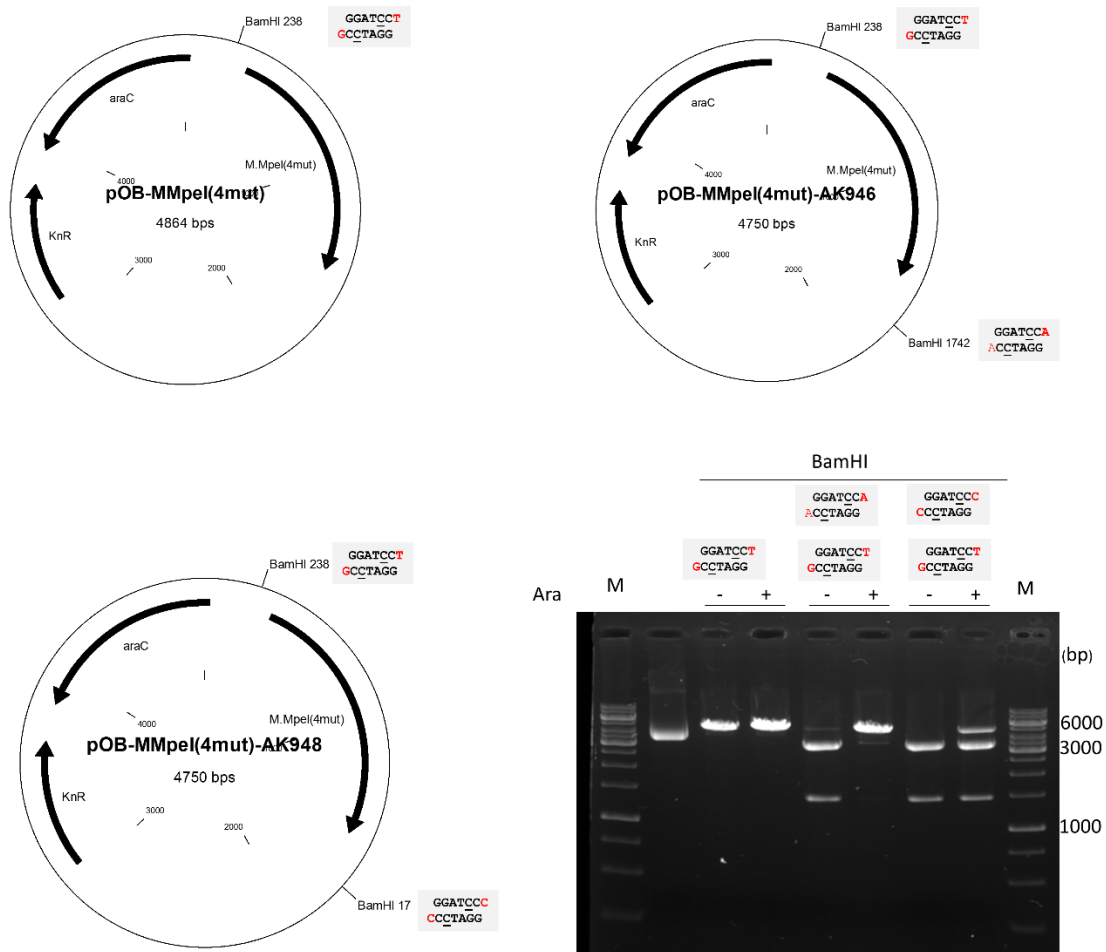


40. ábra: Az *M.Mpel*($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) mutáns 3' oldali határoló nukleotid preferenciájának vizsgálata *in vivo* metilált plazmidok restrikciós emésztésével.

Annak érdekében, hogy további bizonyosságot szerezzünk a négyes mutáns CCa, illetve CCc (az aláhúzott citozin metilációját vizsgáltuk) szekvenciák iránti preferenciájáról, a pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) plazmidba beépítettünk egy második BamHI helyet. Kétféle plazmidváltozatot készítettünk. Az egyikben az új BamHI felismerőhely 3' végeit A, a másikban C határolta.

A BamHI hely beépítéséhez az AK946/947, illetve az AK948/949 oligonukleotid duplexeket (a szekvenciát lásd az 1. táblázatban) az Eco31I és Psp1406I enzimekkel emésztett pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) plazmidba ligáltuk.

Az arabinózzal indukált kultúrából izolált pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-AK946 és pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-AK948 plazmidok BamHI emésztési képén látható, hogy az újonnan beépített BamHI hely teljesen, illetve részlegesen védett az emésztéssel szemben (41. ábra). A védettség mértéke CCa szekvenciával átfedő BamHI helyet tartalmazó plazmid (pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-AK946) esetében nagyobb, mint CCc szekvenciával átfedő BamHI helyet tartalmazó plazmidváltozat esetében (pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-AK946). A fenti *in vivo* kísérletek megerősítik az *in vitro* mérések eredményeit, mely szerint a mutáns enzim azokat a CC helyeket részesíti előnyben, melyek 3' végét adenin vagy citozin határolja.

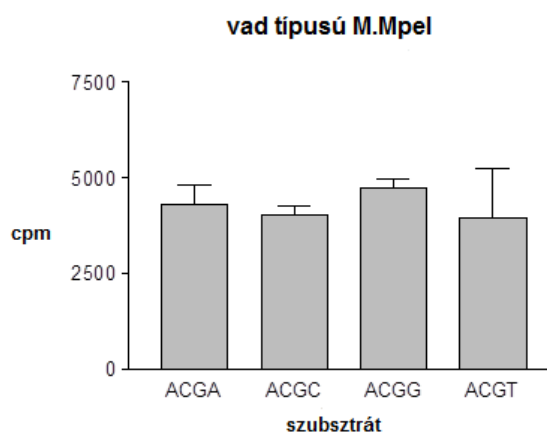


41. ábra: A pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N), pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-AK946 és a pOB-MMpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N)-948 plazmidok térképe és BamHI emésztési képe. Az utóbbi két plazmid egy második BamHI helyet is tartalmaz. Az egyes BamHI helyek 3' végi határoló nukleotidjai a gél felett láthatóak piros színnel kiemelve.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a felismerőhelyet 3' oldalról határoló nukleotid befolyásolja-e a vad típusú M.Mpel esetében is a metiláció hatékonyságát. A méréseket a radioizotópos módszerrel végeztük a korábban ismertetett módon, olyan duplaszálú oligonukleotidok felhasználásával, melyekben a CG szubsztráthelyet 3' irányban A, C, G, vagy T követi (AK702-AK703 (ACGA), AK1008-AK1009 (ACGC), AK1010-AK1011 (ACGG) és AK1012-AK1013 (ACGT), az oligonukleotidok teljes szekvenciáját lásd az 1. táblázatban). A 10 perces tartó reakció során a tisztított M.Mpel-et 10 nM koncentrációban alkalmaztuk.

Az 42. ábrán látható, hogy nincs szignifikáns különbség a négy szubsztrát között a beépült radioaktivitásban. A négyes mutánsra (Δ A323+N324G+R326G+E305N) jellemző

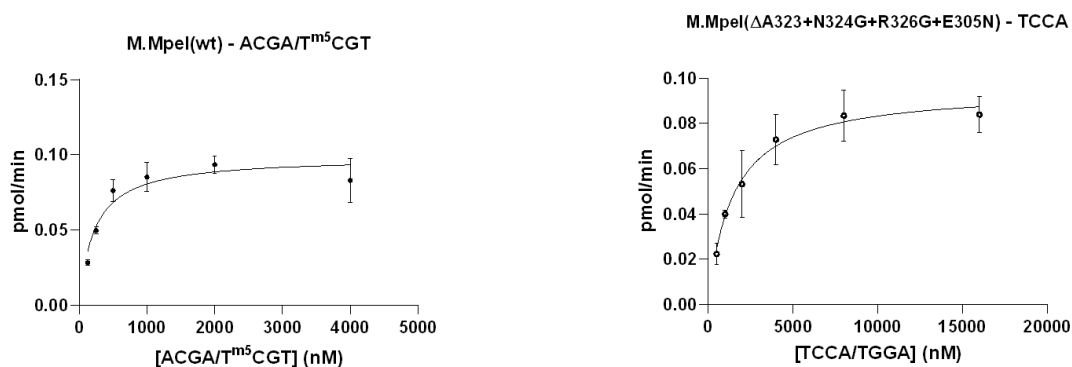
3' végi határolónukleotid preferencia tehát nem jellemző a vad típusú enzimre, az a mutációk következménye lehet.



42. ábra: A 3' végi határoló nukleotidok hatása a vad típusú M.MpeI általi CG metilációra. Három független mérés átlaga.

A határoló nukleotid preferencia jelensége, feltételezve hogy már a hármas mutánsoknál is jelen volt, magyarázattal szolgálhat az V.4.1 alfejezetben ismertetett ellentmondásra. A BsuRI emésztés alapján a $\Delta A323+N324G+E305N$ mutáns nagyobb CC aktivitással rendelkezett, mint a $\Delta A323+N324G+E305A$. A tisztított enzimekkel végzett mérések viszont nem tükrözték ezt a megfigyelést. A pET28 plazmidban 23 BsuRI hely található, melyek több mint felében (14/23) a CC motívum 3' végét A vagy C határolja legalább az egyik szálon és 5' végét minden esetben G szegélyezi. Az *in vitro* méréseket viszont az AK709/709 oligonukleotidokkal végeztük, melyben a CC helyet adeninek határolják mindkét oldalon, ami viszonylag rossz szubsztrát az enzim számára (39/A. ábra).

A tisztított vad típusú M.MpeI-el és a négyes mutánssal steady-state kinetikai méréseket végeztünk (43. ábra, 8. táblázat). A vad típusú enzim esetében a hemimetilált CG (CG/m^5CG) szubsztrátra vonatkozó kinetikai paramétereket határoztuk meg (AK702/703). A négyes mutánssal végzett mérésekhez a tCCa helyet tartalmazó oligoduplexet használtuk, mely a korábbi kísérletek során az egyik legjobb szubsztrátnak bizonyult (39/A. ábra).



43. ábra: A vad típusú (balra) és $\Delta A323+N324G+R326G+E305N$ mutáns (jobbra) M.MpeI enzimek steady-state kinetikai analízise.

enzimkinetikai jellemzők	M.MpeI AC GA T ^{G^{m5}} CT	M.MpeI($\Delta A323+N324G+R326G+E305N$) TCCA AGGT
V_{max} (pmol/perc)	0.09850	0.09536
K_m (nM)	221	1449
K_{cat} (1/perc)	0.65	0.009
K_{cat}/K_m (1/perc x nM)	0.0029	0.0000062

8. táblázat: A: $\Delta A323+N324G+R326G+E305N$ mutáns kinetikai jellemzői

A négyes mutáns ATccAA szubsztráton mutatott K_m értéke közelítőleg 6,8-szor nagyobb, mint a vad típusú enzim 5'-CG/^{m5}CG szubsztráton mutatott K_m értéke. A k_{cat}/K_m értékek alapján a mutáns enzim ATccAA szubsztráton mutatott aktivitása ~470-szer volt alacsonyabb, mint a vad típusú enzim kanonikus szubsztráton (5'-CG/^{m5}CG) mért aktivitása.

VI. Az eredmények megvitatása

A célunk olyan M.Mpel mutánsok előállítása volt, melyek képessé váltak a CA és/vagy CT és/vagy CC dinukleotidok metilálására, ugyanakkor elvesztették a vad típusú enzimre jellemző CG metilációs aktivitást. A kívánt specifitású enzimek új eszközöket adnának a kezünkbe az emlős genomokban előforduló nem-kanonikus citozin metiláció tanulmányozására.

A mutagenesis-kísérletek megkezdése előtt megvizsgáltuk, hogy a vad típusú M.Mpel-nek van-e másodlagos aktivitása a nem-CG dinukleotidokon. A metiltranszferázt túltermelő *E. coli* sejtekből izolált plazmidokat olyan restriktáz enzimekkel emésztettük, melyeket a CH szekvenciakörnyezetben található citozinok metilációja gátol. Az emésztési képeken nem láttunk nem-kanonikus metilációra utaló védett fragmentumokat. Ez az eredmény összhangban van a korábban közölt biszulfitos szekvenálási adatokkal (Wojciechowski és mtsai., 2013). Összeségében, a vad típusú M.Mpel kiemelkedően magas szekvenciaspecifitással rendelkezik. Mivel a rövid (2 bp) felismerőszekvencia miatt a lehetséges bázisspecifikus kölcsönhatások száma kicsi, feltehetően indirekt felismerési mechanizmusok is szerepet játszhatnak az M.Mpel általi szekvenciaspecifikus DNS felismerésben.

A projekt első szakaszában azt a célt tűztük ki, hogy a CG specifitást CN-re rontjuk, melyet helyspecifikus mutagenézissel kívántunk megvalósítani. A mutációkat a CG-bázispár nagy árki felszínével kölcsönhatásba lépő felismerőhurkokban hoztuk létre. Először a nem-szubsztrát szálaban lévő C és G közé ékelődő 302-es fenilalanint cseréltük más aminosavakra (A, Q, M, T, W). Feltételezések szerint az F302 interkaláció egy indirekt szekvenciafelismerési mechanizmus része lehet, amely a DNS szekvenciától függő torzíthatóságán alapul. Egyik F302 mutáns esetében sem tudtunk megváltozott specifitást kimutatni.

A következő lépésben azokat az aminosavakat cseréltük, melyek részt vesznek az enzim és a CG felismerőhely második bázispárja (5'-CG/5'-CG) közötti hidrogénhidak kialakításában. Az 1. felismerőhurokban elhelyezkedő, a nem szubsztrát szálaban lévő citozint felismerő 305-ös glutaminsav cseréje nem vezetett eredményre. A 2. felismerőhurokban található 323-mas alanin a metilálendő citozin melletti guanint ismeri

fel. A kölcsönhatás megzavarását megnehezítette, hogy az A323 esetében nem az oldallánc, hanem a főlánc vesz részt a hidrogénhid kialakításában. Az A323 mutánsok (A323P, A323V) gyenge CG metilációs aktivitást mutattak.

Az első mutáns, amely esetében ki tudtunk mutatni nem-kanonikus metilációt az M.Mpel(A323G+S325G+E305A) volt. Az A323G és az S325G mutációk beépítésének célja az volt, hogy fokozza a 323. aminosav mozgékonyágát destabilizálva ezzel a főlánc és a metilálandó citozint követő guanin közötti hidrogénhidat. Az E305A mutációt is beépítettük, hogy a komplementer bázis felismerését is megzavarjuk. A hármas mutáns a CG helyek mellett elsősorban a CA dinukleotidokat metilálta.

A fenti eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a CG és CH helyek közötti különbségtétel elsősorban a 2. felismerőhurokban található A323 által létesített hidrogénhid közreműködésével valósul meg. Ezt a kölcsönhatást megpróbáltuk úgy is megzavarni, hogy az A323 aminosavat eltávolítottuk a fehérjéből. Az A323 deléció kombinálva az N324G és E305A szubsztitúcióval egy olyan M.Mpel változatot eredményezett (Δ A323+N324G+E305A), amely nagyobb nem-kanonikus aktivitással rendelkezett, mint a M.Mpel(A323G+S325G+E305A) hármas mutáns. Az N324G mutáció jelentősen megnövelte az enzim metilációs aktivitását a csak a deléciót tartalmazó mutánsához képest, aminek feltehetően az volt az oka, hogy megszüntette az A323 deléció által okozott szerkezeti torzulást. Az E305A mutáció beépítése, amely a komplementer citozin felismerését zavarta meg, tovább fokozta a nem-CG helyeken történő metilációt. Tisztított enzimmel végzett *in vitro* mérések alapján a (Δ A323+N324G+E305A) mutáns továbbra is elsősorban a CG dinukleotidokat metilálta. A CA/CG és a CC/CG metilációs aktivitás aránya $\sim 0,65$, illetve $\sim 0,4$ volt. A mutánsnak nem volt kimutatható aktivitása a CT dinukleotidokon, tehát az enzim nem egy CN, hanem egy CV (V = G, A, vagy C) specifikus C5-MTáz.

Annak érdekében hogy olyan M.Mpel változatokat állítsunk elő, melyek előnyben részesítik a CH helyeket a kanonikus CG dinukleotiddal szemben az M.Mpel(Δ A323+N324G+E305A) hármas mutánst kódoló gén C-terminális felét, amely a targetfelismerő domént tartalmazza, random mutagenézisnek vetettük alá és szelektáltunk azokra az M.Mpel változatokra, amelyek specifikitása tovább változott CH irányba.

A CH helyeket metiláló M.Mpel változatok szelektálására egy olyan restrikciós emésztésen alapuló technikát használtunk, melyet korábban már sikerrel alkalmaztak megváltozott specifitású MTázok izolálására. A módszer alapja, hogy a termelődött MTáz, feltéve ha aktív enzim, metilálja a saját kódoló plazmidját, így az hordozza az adott mutánsra jellemző metilációs mintázatot. A sejtekből izolált plazmidokat az Eco47I restrikciós endonukleázzal emésztettük, melyet a CH specifikus metiláció gátol. Azt reméltük, hogy a kívánt specifitású enzimváltozatokat kódoló plazmidok túlélnek az emésztést és transzformálással visszanyerhetők.

A szelekció eredményeként kapott enzim, az M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305A), egyetlen új aminosav cserét okozó mutációt (R326G) tartalmazott, mely a 2. felismerőhurokban helyezkedik el. A restrikciós védési tesztek alapján a mutáns enzim képes volt metilálni a nem-kanonikus felismerőhelyeket, ugyanakkor jelentősen gyengébb aktivitást mutatott a CG dinukleotidokon, mint a EP-PCR mutagenézisben templátként használt hármast mutáns. Az E305N szubsztitúció beépítésével sikerült növelni a CC dinukleotidokon mutatott aktivitást, miközben a CG helyek metilációja tovább csökkent. Az így létrehozott M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) négyes mutáns az *in vitro* mérések alapján hatékonyan metilálta a CC dinukleotidokat és nagyon gyenge aktivitást mutatott a CG és CA helyeken. CT metiláció nem volt kimutatható.

In vitro és *in vivo* vizsgálatok alapján a négyes mutáns markáns preferenciát mutatott azon CC helyek iránt, melyeket 3' irányban A vagy C határolt. A 5' határoló nukleotid hatása a metiláció hatékonyságára kevésbé volt jelentős, az enzim mind a négy nukleotidot elfogadta, ugyanakkor az Acc kissé rosszabb szubsztrátnak bizonyult mint a Gcc, Tcc, és a Ccc.

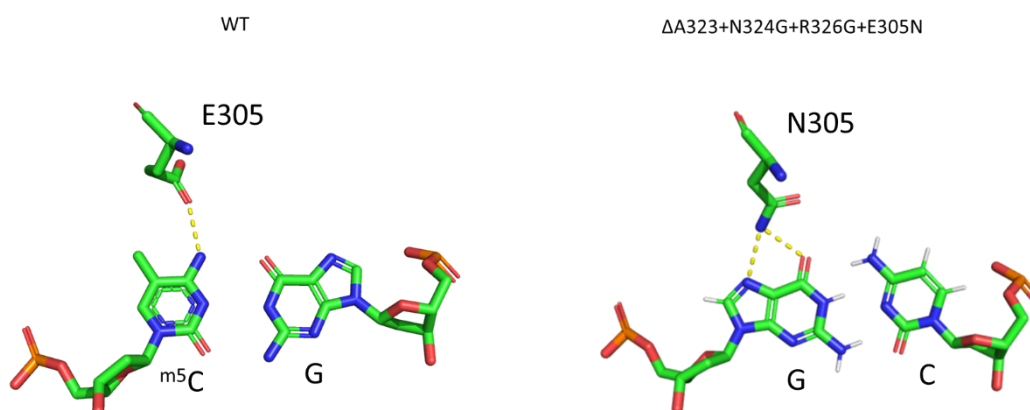
A vad típusú M.Mpel azonos hatékonysággal metilálta a CGA, CGG, CGC, CGT szubsztrátokat, tehát a M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) változat esetében tapasztalt 3' határoló nukleotid preferencia a mutációk (egy nem kívánt) következménye lehet.

Az enzimkinetikai mérések alapján a négyes mutáns katalitikus hatékonysága jelentősen rosszabb, mint a vad típusú M.Mpel enzimé. Azonban érdemes megjegyezni, hogy még ez a viszonylag alacsony aktivitás is jobb, mint az eukarióta *de novo* DNS-metiltranszferáz Dnmt3a esetében mért aktivitás (Aoki és mtsai., 2001).

A DNS-metiltranszferázok szekvenciaspecifitásának megváltoztatása régóta kutatott téma és a kevés eredményes próbálkozás, amit ismerünk elsősorban a véletlenszerű mutagenézis és a kívánt specifitásra történő szelekció kombinálására épített.

Ennek az irányított enzimevolúciós megközelítésnek a mi munkánkban is fontos szerep jutott. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy az azt megelőző, a röntgendifrakciós szerkezeti modell alapján tervezett mutációkat magába foglaló lépések is nélkülözhetetlenek voltak, mivel lehetővé tették egy relaxált specifitású M.Mpel változat előállítását, ami a kiindulási alapja volt a random mutagenézises kísérletnek. Összességében a munkánk kiválóan demonstrálja, hogy a racionális fehérjetervezés és az irányított evolúció kombinálása hatékony stratégia lehet egy fehérje valamely tulajdonságának megváltoztatására.

Az munka során elért szekvenciaspecifitás-változás (CG $\rightarrow$ CCM) szerkezeti hátterének megismerése céljából az I-TASSER platform segítségével elkészítettük a M.Mpel(Δ A323+N324G+R326G+E305N) négyes mutáns prediktált 3D szerkezeti modelljét. A CC specifitásra részben magyarázattal szolgálhat, hogy a prediktált szerkezet alapján az 1. felismerőhurokban található N305 képes lehet hidrogénhidat létesíteni a nem szubsztrát szálban elhelyezkedő guaninnal (5'-CC/5'-GG) (44. ábra). A 2. felismerőhurokba beépített változások szerepéről a modell alapján nem tudtunk konkrét következtetéseket levonni, ezek a mutációk valószínűleg indirekt módon járulnak hozzá a megváltozott fenotípushoz.



44. ábra: A 305. aminosav szerepe a szubsztrátfelismerésben a vad típusú és a Δ A323+N324G+R326G+E305N négyes mutáns M.Mpel esetében.

A munka során elsőként sikerült egy olyan DNS-metiltranszferáz szekvenciaspecifitását megváltoztatni, amely az emlős MTázokhoz hasonlóan rövid (dinukleotid) felismerőszekvenciával rendelkezik. Tudomásunk szerint az általunk izolált mutánshoz hasonló szekvenciaspecifitású C5-metiltranszferázokat még nem írtak le.

VII. Jövőbeli tervek

A munka során egy olyan CC helyeket metiláló DNS-MTáz nyertünk, amely markáns preferenciát mutat azon CC dinukleotidok iránt, melyek 3' oldalát A vagy G határolja. A CC metiláció biológiai szerepének tanulmányozásához előnyösebb lenne egy olyan enzimváltozat, amely hasonló hatékonysággal metilálja valamennyi CC helyet, azok szekvenciakörnyezetétől függetlenül. Ilyen mutánsokra talán a legegyszerűbben BsuRI emésztéssel lehetne szelektálni egy olyan rendszerben, ahol a mutáns könyvtárat hordozó vektorban található BsuRI helyek együttesen valamennyi CCN hellyel átfednek. A fenti munka során a mutáns (a vad típusú M.Mpel enziméhez képest meglehetősen alacsony) katalitikus aktivitásán is lehetne javítani. Az indukciós idő, vagy az induktor koncentráció fokozatos csökkentésével és a plazmidpreparátum minden szelekciós lépésben megismételt emésztésével elvben szelektálhatók lennének egyre nagyobb aktivitással rendelkező MTáz variánsok.

Mivel emlősökben a nem-kanonikus citozin metiláció leggyakrabban CA szekvenciakörnyezetben fordul elő, terveink között szerepel az is, hogy megpróbáljuk az M.Mpel-et egy CA specifikus MTázzá alakítani. A munkához kiindulási alapnak a $\Delta A323+N324G+R326G+E305A$ mutáns lehet a legalkalmasabb, amely a CA és CC metiláció mellett nagyon gyenge aktivitást mutat a natív CG helyeken. A szelekciós rendszert úgy módosítanánk, hogy alkalmas legyen a CA helyeken metilált plazmidok visszanyerésére. Ehhez olyan Alw44I helyeket építenénk be a pOK-BAD vektorba, melyeket úgy terveznénk meg, hogy a metilációra érzékeny 3' végi citozinokat mindkét DNS szálon adenin kövesse.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőmnek Dr. Kiss Antalnak a lehetőséget, hogy a csoportjában dolgozhattam. Köszönöm neki a munkám során kapott hasznos tanácsokat, a stabil és nyugodt munkakörnyezetet.

Köszönettel tartozom a DNS-Fehérje Kölcsönhatások Csoport összes jelenlegi és volt tagjának: Karcagi Ildikónak, Koncz Mihálynak, Pletl Zitának, Stier Ildikónak, Szentés Saroltának, Tímár Editnek, Varga Bencének, Zsibrita Nikolettnek.

Köszönöm Ferenc Györgyinek, hogy biztosította a munkához szükséges oligonukleotidokat.

Végül köszönöm családomnak az évek során tanúsított támogatást és türelmet.

IX. Hivatkozások jegyzéke

- Adhikari, S., & Curtis, P. D. (2016). DNA methyltransferases and epigenetic regulation in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(5), 575–591. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw023>
- Albert, P., Varga, B., Zsibrita, N., & Kiss, A. (2018). Circularly permuted variants of two CG-specific prokaryotic DNA methyltransferases. *PLoS ONE*, 13(5), e0197232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197232>
- Aoki, A., Suetake, I., Miyagawa, J., Fujio, T., Chijiwa, T., Sasaki, H., & Tajima, S. (2001). Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 29(17), 3506–3512. <https://doi.org/10.1093/nar/29.17.3506>
- Balganesh, T. S., Reiners, L., Lauster, R., Noyer-Weidner, M., Wilke, K., & Trautner, T. A. (1987). Construction and use of chimeric SPR/phi 3T DNA methyltransferases in the definition of sequence recognizing enzyme regions. *The EMBO Journal*, 6(11), 3543. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02681.x>
- Barau, J., Teissandier, A., Zamudio, N., Roy, S., Nalesso, V., Hérault, Y., Guillou, F., & Bourc'his, D. (2016). The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*, 354(6314), 909–912. <https://doi.org/10.1126/science.aah5143>
- Barrès, R., Osler, M. E., Yan, J., Rune, A., Fritz, T., Caidahl, K., Krook, A., & Zierath, J. R. (2009). Non-CpG Methylation of the PGC-1 α Promoter through DNMT3B Controls Mitochondrial Density. *Cell Metabolism*, 10(3), 189–198. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.07.011>
- Berdis, A. J., Lee, I., Coward, J. K., Stephens, C., Wright, R., Shapiro, L., & Benkovic, S. J. (1998). A cell cycle-regulated adenine DNA methyltransferase from *Caulobacter crescentus* processively methylates GANTC sites on hemimethylated DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(6), 2874–2879. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2874>
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J., & Macleod, D. (1985). A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40(1), 91–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90312-5)
- Bonasio, R., Li, Q., Lian, J., Mutti, N. S., Jin, L., Zhao, H., Zhang, P., Wen, P., Xiang, H., Ding, Y., Jin, Z., Shen, S. S., Wang, Z., Wang, W., Wang, J., Berger, S. L., Liebig, J., Zhang, G., & Reinberg, D. (2012). Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *Current biology : CB*, 22(19), 1755–1764. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.042>
- Borgaro, J. G., Benner, N., & Zhu, Z. (2013). Fidelity index determination of DNA methyltransferases. *PloS One*, 8(5), e63866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063866>
- Borgel, J., Guibert, S., Li, Y., Chiba, H., Schübeler, D., Sasaki, H., Forné, T., & Weber, M. (2010). Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genetics*, 42(12), 1093–1100. <https://doi.org/10.1038/ng.708>

- Bourc'his, D., Xu, G.-L., Lin, C.-S., Bollman, B., & Bestor, T. H. (2001). Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*, 294(5551), 2536–2539. <https://doi.org/10.1126/science.1065848>
- Boyes, J., & Bird, A. (1992). Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: Evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *The EMBO Journal*, 11(1), 327–333. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05055.x>
- Chahar, S., Elsayy, H., Ragozin, S., & Jeltsch, A. (2010). Changing the DNA recognition specificity of the EcoDam DNA-(adenine-N6)-methyltransferase by directed evolution. *Journal of Molecular Biology*, 395(1), 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.027>
- Chen, K., & Arnold, F. H. (1993). Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: Sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5618–5622. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5618>
- Chen, Z., & Riggs, A. D. (2011). DNA Methylation and Demethylation in Mammals. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18347–18353. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.205286>
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J. W., & Roberts, R. J. (1993). Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell*, 74(2), 299–307. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90421-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90421-I)
- Cohen, H. M., Tawfik, D. S., & Griffiths, A. D. (2004). Altering the sequence specificity of HaeIII methyltransferase by directed evolution using in vitro compartmentalization. *Protein Engineering, Design & Selection: PEDS*, 17(1), 3–11. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh001>
- Douvlataniotis, K., Bensberg, M., Lentini, A., Gylemo, B., & Nestor, C. E. (2020). No evidence for DNA N6-methyladenine in mammals. *Science Advances*, 6(12), eaay3335. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3335>
- Du, Q., Luu, P.-L., Stirzaker, C., & Clark, S. J. (2015). Methyl-CpG-binding domain proteins: Readers of the epigenome. *Epigenomics*, 7(6), 1051–1073. <https://doi.org/10.2217/epi.15.39>
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M., Gibbs, R. A., Csörgo, B., Pósfai, G., Weinstock, G. M., & Blattner, F. R. (2008). The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: Insights into the biology of a laboratory workhorse. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2597–2606. <https://doi.org/10.1128/JB.01695-07>
- Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2), 239–259. <https://doi.org/10.2217/epi.09.33>
- Gao, L., Emperle, M., Guo, Y., Grimm, S. A., Ren, W., Adam, S., Uryu, H., Zhang, Z.-M., Chen, D., Yin, J., Dukatz, M., Anteneh, H., Jurkowska, R. Z., Lu, J., Wang, Y., Bashtrykov, P., Wade, P. A., Wang, G. G., Jeltsch, A., & Song, J. (2020). Comprehensive structure-function characterization of DNMT3B and DNMT3A reveals distinctive de novo DNA methylation mechanisms. *Nature Communications*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17109-4>
- Gao, Q., Lu, S., Wang, Y., He, L., Wang, M., Jia, R., Chen, S., Zhu, D., Liu, M., Zhao, X., Yang, Q., Wu, Y., Zhang, S., Huang, J., Mao, S., Ou, X., Sun, D., Tian, B., & Cheng, A. (2023). Bacterial DNA methyltransferase: A key to the epigenetic world with

- lessons learned from proteobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1129437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1129437>
- Gerasimaitė, R., Vilkaitis, G., & Klimašauskas, S. (2009). A directed evolution design of a GCG-specific DNA hemimethylase. *Nucleic Acids Research*, 37(21), 7332–7341. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp772>
- Gowher, H., & Jeltsch, A. (2018). Mammalian DNA methyltransferases: New discoveries and open questions. *Biochemical Society transactions*, 46(5), 1191–1202. <https://doi.org/10.1042/BST20170574>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: A laboratory manual* (4th ed). Cold Spring Harbor laboratory press.
- Greene, P. J., Poonian, M. S., Nussbaum, A. L., Tobias, L., Garfin, D. E., Boyer, H. W., & Goodman, H. M. (1975). Restriction and modification of a self-complementary octanucleotide containing the EcoRI substrate. *Journal of Molecular Biology*, 99(2), 237–261. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(75\)80143-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(75)80143-4)
- Guo, J. U., Su, Y., Shin, J. H., Shin, J., Li, H., Xie, B., Zhong, C., Hu, S., Le, T., Fan, G., Zhu, H., Chang, Q., Gao, Y., Ming, G., & Song, H. (2014). Distribution, recognition and regulation of non-CpG methylation in the adult mammalian brain. *Nature Neuroscience*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nn.3607>
- Handa, V., & Jeltsch, A. (2005). Profound Flanking Sequence Preference of Dnmt3a and Dnmt3b Mammalian DNA Methyltransferases Shape the Human Epigenome. *Journal of Molecular Biology*, 348(5), 1103–1112. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.044>
- Hattman, S., Brooks, J. E., & Masurekar, M. (1978). Sequence specificity of the P1 modification methylase (M·Eco P1) and the DNA methylase (M·Eco dam) controlled by the Escherichia coli dam gene. *Journal of Molecular Biology*, 126(3), 367–380. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90046-3)
- He, Y., & Ecker, J. R. (2015). Non-CG Methylation in the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 16, 55–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025437>
- Hermann, A., Goyal, R., & Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase Methylates DNA Processively with High Preference for Hemimethylated Target Sites*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 48350–48359. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403427200>
- Hotchkiss, R. D. (1948). The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 175(1), 315–332.
- Jabbari, K., & Bernardi, G. (2004). Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene*, 333, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.02.043>
- Jang, H. S., Shin, W. J., Lee, J. E., & Do, J. T. (2017). CpG and Non-CpG Methylation in Epigenetic Gene Regulation and Brain Function. *Genes*, 8(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/genes8060148>
- Jang, H., Shin, H., Eichman, B. F., & Huh, J. H. (2014). Excision of 5-hydroxymethylcytosine by DEMETER family DNA glycosylases. *Biochemical and biophysical research communications*, 446(4), 1067–1072. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.060>

- Jeltsch, A., & Jurkowska, R. Z. (2016). Allosteric control of mammalian DNA methyltransferases—A new regulatory paradigm. *Nucleic Acids Research*, 44(18), 8556–8575. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw723>
- Jobling, M. G., Raleigh, E. A., & Frank, D. N. (2016). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* ER1821R, a Laboratory K-12 Derivative Engineered To Be Deficient in All Methylcytosine and Methyladenine Restriction Systems. *Genome Announcements*, 4(4), e00763-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00763-16>
- Jurkowska, R. Z., & Jeltsch, A. (2016). Enzymology of Mammalian DNA Methyltransferases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 945, 87–122. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43624-1_5
- Khersonsky, O., Roodveldt, C., & Tawfik, D. S. (2006). Enzyme promiscuity: Evolutionary and mechanistic aspects. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10(5), 498–508. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.08.011>
- Kinde, B., Gabel, H. W., Gilbert, C. S., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2015). Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22), 6800–6806. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411269112>
- Kiss, A., Posfai, G., Keller, C. C., Venetianer, P., & Roberts, R. J. (1985). Nucleotide sequence of the BsuRI restriction-modification system. *Nucleic Acids Research*, 13(18), 6403. <https://doi.org/10.1093/nar/13.18.6403>
- Kiss, A., Pósfai, G., Zsurka, G., Raskó, T., & 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 Research*, 29(15), 3188–3194.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J., & Cheng, X. (1994). HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, 76(2), 357–369. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90342-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90342-5)
- Klimašauskas, S., Nelson, J. L., & Roberts, R. J. (1991). The sequence specificity domain of cytosine-C5 methylases. *Nucleic Acids Research*, 19(22), 6183–6190. <https://doi.org/10.1093/nar/19.22.6183>
- Koudan, E. V., Bujnicki, J. M., & Gromova, E. S. (2004). Homology modeling of the CG-specific DNA methyltransferase SssI and its complexes with DNA and AdoHcy. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 22(3), 339–345. <https://doi.org/10.1080/07391102.2004.10507005>
- Kumar, S., Cheng, X., Klimasauskas, S., Mi, S., Posfai, J., Roberts, R. J., & Wilson, G. G. (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 22(1), 1–10.
- Larsen, F., Gundersen, G., Lopez, R., & Prydz, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics*, 13(4), 1095–1107. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90024-M](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90024-M)
- Lederberg, E. M., & Cohen, S. N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 119(3), 1072–1074. <https://doi.org/10.1128/jb.119.3.1072-1074.1974>
- Lee, J.-H., Park, S.-J., & Nakai, K. (2017). Differential landscape of non-CpG methylation in embryonic stem cells and neurons caused by DNMT3s. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11800-1>

- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915–926. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-F)
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J. R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.-M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A. H., Thomson, J. A., Ren, B., & Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), Article 7271. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Lucibelli, F., Valoroso, M. C., & Aceto, S. (2022). Plant DNA Methylation: An Epigenetic Mark in Development, Environmental Interactions, and Evolution. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158299>
- Lyko, F., Foret, S., Kucharski, R., Wolf, S., Falckenhayn, C., & Maleszka, R. (2010). The Honey Bee Epigenomes: Differential Methylation of Brain DNA in Queens and Workers. *PLoS Biology*, 8(11), e1000506. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000506>
- Mallona, I., Ilie, I. M., Karemaker, I. D., Butz, S., Manzo, M., Caflisch, A., & Baubec, T. (2021). Flanking sequence preference modulates de novo DNA methylation in the mouse genome. *Nucleic Acids Research*, 49(1), 145–157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1168>
- Matsuo, K., Silke, J., Gramatikoff, K., & Schaffner, W. (1994). The CpG-specific methylase SssI has topoisomerase activity in the presence of Mg²⁺. *Nucleic Acids Research*, 22(24), 5354–5349. <https://doi.org/10.1093/nar/22.24.5354>
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769), Article 6769. <https://doi.org/10.1038/35000656>
- Mellen, M., Ayata, P., Dewell, S., Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2012). MeCP2 binds to 5hmc enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, 151(7), 1417–1430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.022>
- Nakaoka, T., Saito, Y., & Saito, H. (2017). Aberrant DNA Methylation as a Biomarker and a Therapeutic Target of Cholangiocarcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1111. <https://doi.org/10.3390/ijms18061111>
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., & Li, E. (1999). DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell*, 99(3), 247–257. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81656-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81656-6)
- Patil, V., Ward, R. L., & Hesson, L. B. (2014). The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics*, 9(6), 823–828. <https://doi.org/10.4161/epi.28741>
- Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases—A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7489–7527. <https://doi.org/10.1093/nar/gku447>
- Poddar, S., Chakravarty, D., & Chakrabarti, P. (2018). Structural changes in DNA-binding proteins on complexation. *Nucleic Acids Research*, 46(7), 3298–3308. <https://doi.org/10.1093/nar/gky170>
- Ponger, L., Duret, L., & Mouchiroud, D. (2001). Determinants of CpG Islands: Expression in Early Embryo and Isochore Structure. *Genome Research*, 11(11), 1854–1860. <https://doi.org/10.1101/gr.174501>

- Pósfai, J., Bhagwat, A. S., Pósfai, G., & Roberts, R. J. (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Research*, 17(7), 2421–2435.
- Ramsahoye, B. H., Biniszkievicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5237–5242. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.10.5237>
- Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G. G., Rottem, S., & 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 Research*, 18(5), 1145–1152.
- Roberts, R. J., Vincze, T., Posfai, J., & Macelis, D. (2023). REBASE: A database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D629–D630. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac975>
- Robertson, K. D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nature Reviews. Genetics*, 6(8), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg1655>
- Rockah-Shmuel, L., & Tawfik, D. S. (2012). Evolutionary transitions to new DNA methyltransferases through target site expansion and shrinkage. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11627–11637. <https://doi.org/10.1093/nar/gks944>
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *CSH Protocols*, 2006(4). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4540>
- Saxonov, S., Berg, P., & Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1412–1417. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>
- Shen, J. C., Rideout, W. M., & Jones, P. A. (1992). High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell*, 71(7), 1073–1080. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(05\)80057-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(05)80057-1)
- Silva, D., Santos, G., Barroca, M., & Collins, T. (2017). Inverse PCR for Point Mutation Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1620, 87–100. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5_5
- Ślaska-Kiss, K., Tímár, E., & Kiss, A. (2012). Complementation between inactive fragments of SssI DNA methyltransferase. *BMC Molecular Biology*, 13, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-13-17>
- Smith, Z. D., Chan, M. M., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Gnirke, A., Regev, A., & Meissner, A. (2012). A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*, 484(7394), 339–344. <https://doi.org/10.1038/nature10960>
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27816–27823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>
- Szomolányi, E., Kiss, A., & Venetianer, P. (1980). Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli*. *Gene*, 10(3), 219–225. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(80\)90051-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(80)90051-7)
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L. M., Liu, D. R., Aravind, L., & Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 930–935. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>

- Tímár, E., Groma, G., Kiss, A., & Venetianer, P. (2004). Changing the recognition specificity of a DNA-methyltransferase by in vitro evolution. *Nucleic Acids Research*, 32(13), 3898–3903. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh724>
- Tímár, E., Venetianer, P., & Kiss, A. (2008). In Vivo DNA Protection by Relaxed-Specificity SinI DNA Methyltransferase Variants. *Journal of Bacteriology*, 190(24), 8003–8008. <https://doi.org/10.1128/JB.00754-08>
- Urieli-Shoval, S., Gruenbaum, Y., Sedat, J., & Razin, A. (1982). The absence of detectable methylated bases in *Drosophila melanogaster* DNA. *FEBS Letters*, 146(1), 148–152. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80723-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80723-0)
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, 39(4), 457–466. <https://doi.org/10.1038/ng1990>
- Wojciechowski, M., Czapinska, H., & Bochtler, M. (2013). CpG underrepresentation and the bacterial CpG-specific DNA methyltransferase M.Mpel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(1), 105–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207986110>
- Wu, J. C., & Santi, D. V. (1987). Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(10), 4778–4786.
- Xu, Q., & Xie, W. (2018). Epigenome in Early Mammalian Development: Inheritance, Reprogramming and Establishment. *Trends in Cell Biology*, 28(3), 237–253. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.008>
- Yang, X., Han, H., De Carvalho, D. D., Lay, F. D., Jones, P. A., & Liang, G. (2014). Gene Body Methylation can alter Gene Expression and is a Therapeutic Target in Cancer. *Cancer cell*, 26(4), 577–590. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.028>
- Yoder, J. A., Walsh, C. P., & Bestor, T. H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Genetics: TIG*, 13(8), 335–340. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(97\)01181-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(97)01181-5)
- Zhang, Z.-M., Lu, R., Wang, P., Yu, Y., Chen, D., Gao, L., Liu, S., Ji, D., Rothbart, S. B., Wang, Y., Wang, G. G., & Song, J. (2018). Structural basis for DNMT3A-mediated de novo DNA methylation. *Nature*, 554(7692), 387–391. <https://doi.org/10.1038/nature25477>
- Ziller, M. J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C., Boyle, P., Epstein, C. B., Bernstein, B. E., Lengauer, T., Gnirke, A., & Meissner, A. (2011). Genomic Distribution and Inter-Sample Variation of Non-CpG Methylation across Human Cell Types. *PLOS Genetics*, 7(12), e1002389. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002389>

X. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapjául szolgáló publikáció:

Albert, P., Varga, B., Ferenc, G. & Kiss, A. (2024) Conversion of the CG specific M.MpeI DNA methyltransferase into an enzyme predominantly methylating CCA and CCC sites. *Nucleic Acids Res.* **52**, 1896–1908.

Egyéb publikációk:

Albert, P., Varga, B., Zsibrita, N., and Kiss, A. (2018). Circularly permuted variants of two CG-specific prokaryotic DNA methyltransferases. *PLoS One* **13**, e0197232–e0197255. doi:10.1371/journal.pone.0197232

Ślaska-Kiss, K., Zsibrita, N., Koncz, M., Albert, P., Csábrádi, Á., Szentes, S. and Kiss, A. (2021) Lowering DNA binding affinity of SssI DNA methyltransferase does not enhance the specificity of targeted DNA methylation in *E. coli*. *Scientific Reports*, **11**, 15226.

XI. Magyar és angol nyelvű összefoglaló

XI.1. Magyar nyelvű összefoglaló

Emlős genomokban a CG dinukleotidokban elhelyezkedő citozinok egy része metilált formában (C5-metilcitozin) van jelen. A CG-metiláció mint epigenetikai jel fontos szerepet játszik többek között a génexpresszió szabályozásában, az embrionális fejlődésben, az X-kromoszóma inaktivációban, valamint az imprinting jelenségében. Feltételezik, hogy az abnormális genomi metiláció hozzájárulhat különféle betegségek (pl. a rák) kialakulásához.

A közelmúltban felfedezték, hogy bizonyos sejttípusokban a CA, CT és CC (röviden: CH) dinukleotidokban található citozinok is metilálódhatnak. Ennek a nem-kanonikus metilációnak jelenleg nem ismert a biológiai szerepe. A CG és a CH-metilációért is ugyanazok az enzimek (Dnmt3a és Dnmt3b) a felelősek.

A nem-CG metiláció kutatását nagyban elősegítené, ha elérhetőek lennének olyan enzimek, melyekkel célzottan metilálni lehetne a CH helyeket, anélkül hogy befolyásolnánk a CG-metilációs mintázatot. Jelenleg ilyen specifitású C5-MTázok nem ismertek.

Munkánk során célul tűztük ki a bakteriális M.Mpel DNS-metiltranszferáz olyan mutánsainak előállítását, melyek szekvenciaspecifitása CG-ről CH-ra (CA, CT, CC, vagy ezek kombinációja) változott.

A projekt első szakaszában arra törekedtünk, hogy a CG specifitást CN-re rontsuk, melyet helyspecifikus mutagenézissel kívántunk elérni. A mutagenizálandó aminosavak kiválasztásánál felhasználtuk az M.Mpel DNS-sel alkotott specifikus komplexének rtg. diffrakciós szerkezetéből nyerhető információt. Elsősorban olyan aminosavakat változtattunk helyspecifikus mutagenézissel, amelyek a felismerőhely nem szubsztrátbázispárjával (5'-CG/5'-CG-3') létesítenek specifikus kölcsönhatásokat. Létrehoztunk olyan enzimváltozatokat is, amelyekben az aromás oldalláncával a nem-szubsztrát szálaban lévő C és G közé ékelődő, jellegzetes torzulást okozó és ezáltal a

szekvenszspecifitásban valószínűleg szerepet játszó 302-es fenilalanint cseréltük más aminosavra. Az elkészült mutánsok között voltak egyszerű aminosavcserék, mikrodélciók, illetve ezek kombinációi. A mutáns enzimek fenotípusának vizsgálatához a MTáz-változatokat kódoló plazmidokat *E. coli* sejtekből izoláltuk, majd olyan restriktációs enzimekkel emésztettük, amelyekről tudtuk, hogy működésüket a keresett relaxált specifitású metiláció megakadályozná. A védett fragmentumok megjelenéséből, méretéből következtettünk a mutáns enzimek megváltozott specifitására.

A relaxált specifitású M.Mpel változat előállításához a nem-szubsztrát bázispár mindkét tagjának felismerését meg kellett szüntetnünk. A 2. felismerőhurokban található A323 főlánca és a metilálandó citozint követő guanin közötti hidrogénhid megzavarásának leghatékonyabb módjának az A323 deléciója bizonyult. A megfelelő aktivitású enzim létrehozásához szükség volt az N324G mutáció beépítésére, amely valószínűleg megszüntetett egy, az A323 deléció által okozott, szerkezeti torzulást. A legjobb aktivitással rendelkező relaxált specifitású mutáns ($\Delta A323 + N324G + E305A$) az *in vitro* mérések alapján a CG helyek mellett a CA és CC dinukleotidokat is elfogadta szubsztrátnak, a CT dinukleotidokat nem metilálta.

A munka második szakaszában az volt a célunk, hogy növeljük az enzim CH specifikus aktivitását, lehetőség szerint a kanonikus CG-metilációs aktivitás rovására.

Az egyik munka során telítési mutagenézist végeztünk, mely azokat az aminosavakat érintette, melyek feltételezéseink szerint szerepet játszhatnak a nem-szubsztrát szálban elhelyezkedő citozin felismerésében(CG/C $\underline{G}$). A sejtekből izolált plazmidok emésztési képe alapján azonosítottunk egy mutánst ($\Delta A323+N324G+E305N$), amely kissé hatékonyabban metilálta a CC helyeket, mint a $\Delta A323+N324G+E305A$. Sajnos ez a változat továbbra is nagymértékben metilálta a kanonikus CG helyeket is.

Egy párhuzamos munka során a $\Delta A323+N324G+E305A$ mutánst kódoló gén egy nagyobb szakaszát (~500 bp) random mutagenézisnek vetettük alá. Ennek eredményeként egy megközelítőleg 60 000 klónból álló plazmidkönyvtárat kaptunk. A könyvtárból Eco47I (felismerőhely: GGWCC, a belső és az 5' végi citozin C5 metilációja véd az emésztéssel szemben) emésztéssel igyekeztünk olyan plazmidokat szelektálni, amely CA és/vagy CC specifitású metiltranszferáz enzimeket kódolnak. Az emésztést túlélő és transzformálással visszanyert plazmidok közül az egyik a $\Delta A323+N324G+R326G+E305A$ négyes mutánst kódolta, amely a védési tesztek alapján

megnövekedett CC specifikus metiltranszferáz aktivitást mutatott. Az R326G mutációnak további előnyös következménye volt, hogy a CG dinukleotidok metilációja csaknem teljesen megszűnt. A két mutagenézis kísérletből származó előnyös mutációk (**E305N** és **R326G**) kombinálásával létrehoztunk egy újabb négyes mutánst ($\Delta A323+N324G+\mathbf{R326G}+\mathbf{E305N}$), amely továbbra is minimális mértékben metilálta a CG helyeket, a CC specifikus metilációs aktivitás viszont tovább fokozódott.

A $\Delta A323+N324G+\mathbf{R326G}+\mathbf{E305N}$ négyes mutáns oldható formában termelődik és nagy mennyiségben tisztítható. Az *in vitro* mérések alapján az enzim mintegy 10-szer gyorsabban metilálta a CC helyeket, mint a kanonikus CG dinukleotidokat. Kimutattuk továbbá, hogy a mutáns markáns preferenciát mutat azon CC szubsztrátok iránt, melyek 3' oldalát A vagy C nukleotidok határolják, tehát az enzim egy CCA és CCC specifikus C5-MTáznak tekinthető, melyhez hasonló enzimet még nem írtak le.

XI.2. Angol nyelvű összefoglaló

In most mammalian cells, a fraction of cytosines located in CG dinucleotides are methylated (C5-methylcytosine). CG methylation is an important epigenetic mechanism, which has roles in a wide range of phenomena such as gene silencing, genomic imprinting, embryonic development and X-chromosome inactivation. Dysregulation of CG methylation is the hallmark of several diseases including cancer. Besides the predominant CG context, C5-methylcytosines were also found in non-CG context; i.e. CA, CT, or CC (collectively: CH). The biological role of non-CG methylation is currently unknown. The same C5-MTases are responsible for both CG- and non-CG-methylation in mammals. Analysis of the biological role of non-CG-methylation would be greatly aided by experimental systems, which would allow targeting of C5-methylation to predetermined genomic non-CG sites *in vivo*. Unfortunately, C5-MTases methylating CA, CC or CT sites are not known to exist.

We aimed to create variants of the CG specific bacterial C5-MTase M.Mpel, which can methylate cytosines in CH (CA, CC, CT, or any combination thereof), but not in CG context. We chose M.Mpel, because it has some advantages (higher activity and the availability of an X-ray structure), compared to the mammalian enzymes or to the commercially available CG-specific bacterial MTase M.SssI. The desired CH-specific

M.Mpel variant could be a useful research tool in the study of the biological role of non-CG specific DNA methylation in higher eukaryotes. Our first objective was broadening (relaxing) the specificity of M.Mpel from CG to CN.

To obtain relaxed specificity variants of M.Mpel, we employed site directed mutagenesis guided by the crystallographic structure of the specific DNA-MTase complex. The primary targets were amino acids contacting the second basepair (E305, A323) of the CG recognition site (5'-CG/5'-CG). A phenylalanine residue (F302), which presumably contributes to indirect sequence readout by inducing a characteristic distortion in the target DNA structure, was also subjected to mutagenesis.

Several mutants including amino acid replacements, microdeletions, or combinations thereof were constructed. The phenotypes of the mutant proteins were first analyzed in *E. coli* using restriction-protection assay: plasmid DNA extracted from cells overexpressing the mutants was digested with restriction endonucleases sensitive to cytosine methylation in specific sequence contexts.

Most M.Mpel variants containing single or double amino acid substitutions retained CG specificity with variable levels of catalytic activity. The specificity change was finally brought about by the deletion of A323, which recognizes the guanine of the second basepair in the CG target site (5'-CG/5'-CG) by a main chain hydrogen bond. Unfortunately, the activity of this mutant (Δ A323) was very low. Inspection of the crystal structure suggested that the diminished activity of the Δ A323 variant could be, at least partly, explained by a steric clash between the rather bulky N324 sidechain and the DNA. This observation prompted us to add the N324G substitution to the deletion mutant. As expected, the double mutant Δ A323+N324G retained the relaxed specificity of Δ A323, but displayed significantly higher overall MTase activity. The MTase activity was further improved by combining the Δ A323+N324G mutations with the E305A substitution, which, by itself, had no effect on specificity. The M.Mpel (Δ A323+N324G+E305A) triple mutant was purified and characterized *in vitro* using [methyl-3H]-labeled S-adenosylmethionine and oligonucleotide duplexes containing single CG, CA, CT, or CC substrate sites. The Δ A323+N324G+E305A mutant methylated CA and CC dinucleotides in addition to the canonical CG, but did not modify CT sites.

In the second part of the work we aimed to achieve a further shift in the specificity of the triple mutant towards non-CG sites using random mutagenesis. A

single-round directed evolution experiment and a further site directed mutation (E305N) yielded the quadruple mutant M.MpeI(Δ A323+N324G+R326G+E305N), which efficiently methylated CC sites but had very low activity on CG dinucleotides. The mutant had a very strong bias towards CC sites flanked by 3' A or C making it a CCA/CCC specific MTase which represents a novel MTase specificity.

XII. Témavezetői nyilatkozat

Más csoporttagok hozzájárulása a munkához a következő volt:

Varga Bence készítette az F302A és a $\Delta 322$ -323 mutánst.

Tanúsítom, hogy a disszertációban leírt eredmények nagyrészt Albert Pál munkájából származnak, aki joggal használhatja fel őket disszertációja megírásához.

Dr. Kiss Antal

témavezető