

Egy DNS-metiltranszferáz specifitásának megváltoztatása tervezett enzimátalakítással és irányított enzimevolúcióval

Ph.D.
értekezés tézisei

Albert Pál

Témavezető: Dr. Kiss Antal (emeritus kutatóprofesszor)

Kutatás helye: HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biokémiai Intézet, DNS-Fehérje Kölcsönhatások
Laboratórium

HUN-REN
Magyar Kutatási Hálózat



Képzés helye: Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola



Szeged
2024

Bevezetés

Az emlősök DNS-ében a citozinok egy része metilált (C5-metilcitozin) formában van jelen. A metilált citozinok többnyire CG (CpG) dinukleotidokban fordulnak elő. A genomi CG metilációs mintázat kialakításáért a Dnmt3a és Dnmt3b metiltranszferázok (*de novo* MTázok) felelnek. A CG metiláció a legrészletesebben ismert epigenetikai jel, mely fontos szerepet játszik olyan folyamatokban, mint az embrionális fejlődés és szöveti differenciáció szabályozása, X-kromoszóma inaktiváció, genomikus imprinting, valamint a transzpozonok csendesítése. Az abnormális metiláció számos patológias állapottal (például a rák) is összefüggésben van.

A közelmúltban felfedezték, hogy emlősökben nem csak a CG, hanem a CA, CT és 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 a CH metilációért is. Ennek következtében nehéz a CH metilációt befolyásolni anélkül, hogy a kanonikus CG metiláció is megváltozzon.

Célkitűzések

Doktori munkám során célul tűztük ki olyan új CH (CA, CT, CC vagy ezek bármilyen kombinációja) specifikus DNS-MTázok előállítását, melyek lehetővé tennék a nem-CG metiláció biológiai szerepének tanulmányozását.

Kiindulási alapnak az M.MpeI nevű enzimet használtuk, amely egy bakteriális CG-specifikus DNS-MTáz. A specifitás megváltoztatását két lépésben terveztük megvalósítani. A munka első szakaszában célunk a CG specifitás CN-re rontása volt a M.MpeI-DNS felismerőkomplex szerkezeti modellje alapján tervezett mutációk beépítésével. A munka második fázisában a relaxált specifitású mutánsokból kiindulva terveztük létrehozni irányított enzimevolúcióval a CH helyeket metiláló enzimeket.

Alkalmazott módszerek

- rekombináns DNS technikák
- helyspecifikus mutagenézis (inverz PCR)
- telítési mutagenézis (inverz PCR)
- „error-prone” PCR mutagenézis
- fehérjetisztítás affinitáskromatográfiával
- DNS szekvenálás
- *in-silico* fehérje modellezés (I-TASSER)

- enzimkinetikai paraméterek meghatározása
- metiltranszferáz mutánsok aktivitásának és specifikitásának jellemzése metilációra érzékeny restriktív enzimekkel (*in vivo*) (lásd az alábbi táblázatot) vagy tríciummal jelölt metilcsoport beépülésének kimutatásával (*in vitro*)

restriktív enzim	felismerő-szekvencia	Az emésztést gátló ^{m5} C metiláció	tesztelhető metiláció specifikitás
Bsh1236I	CGCG GCGC	<u>C</u> GCG GCGC CGCG GCGC	<u>C</u> G
BsuRI	GGCC CCGG	GG <u>C</u> C CCGG	<u>C</u> C
Eco47I	GGWCC CCWGG	GGW <u>C</u> C CCWGG	<u>C</u> N

Az eredmények összefoglalása

Kimutattuk, hogy a vad típusú M.MpeI (az eukarióta Dnmt3a és Dnmt3b enzimekkel ellentétben) nem rendelkezik másodlagos aktivitással a CH szubsztrátokon.

A rendkívül szigorú CG felismerés elrontása céljából számos mutációt (pontmutációk, mikrodeléciók) terveztünk, melyeket az enzim szekvenciaspecifitásáért felelős TRD (Target Recognizing Domain) régiójába építettünk be. Az elsődleges célpontok azok az aminosavak voltak, melyek a CG felismerőhely második bázispárjával (5'-CG-3'/5'-CG-3') létesítenek hidrogénhidakat. Gondolva arra, hogy a szekvenciafelismerésben indirekt DNS-fehérje kölcsönhatások is szerepet játszhatnak, további aminosavakat is mutagenizáltunk, többek között a 302-es fenilalanint, melynek aromás oldallánca beékelődik a CG hely nem szubsztrát szálába, ezáltal egy jellegzetes DNS torzulást előidézve.

A mutánsok többsége nem rendelkezett kimutatható CH aktivitással. A szigorú CG felismerés elrontásához az A323 és a metilálható citozint követő guanin 5'-CG-3'/5'-CG-3' közötti hidrogénhid eltávolítására volt szükség. Ezt leghatékonyabban az A323 deléciójával sikerült elérni. A deléciós mutáns nem-CG helyeken mutatott aktivitásán jelentősen tudtunk javítani két további mutáció beépítésével. Az így létrehozott hármas mutáns($\Delta A323+N324G+E305A$), mely esetében a nem-szubsztrát bázispár mindkét tagjának felismerését elrontottuk, a CG mellett a CA és CC helyeket is hatékonyan metilálta, ugyanakkor a CT helyek metilációja nem volt kimutatható.

A munka második részében a $\Delta A323+N324G+E305A$ hármas mutánsból kiindulva véletlenszerű mutagenézissel igyekeztük a nem-CG specifikus aktivitást fokozni. Az egyik megközelítés során a 305-ös pozíciót (a vad típusú enzimben az E305 a nem szubsztrát-citozin felismeréséért felel, 5'-CG-3'/'%'-'CG-3')) telítési mutagenézisnek vetettük alá. Az egyes klónok specifikitását metilációra érzékeny restriktív enzimek segítségével teszteltük.

Az egyik változat ($\Delta A323+N324G+E305N$) nagyobb védettséget mutatott a CC metiláció által gátolt BsuRI emésztéssel szemben, mint a kiindulásnak használt hármas mutáns ($\Delta A323+N324G+E305A$). Sajnos ez a mutáns továbbra is erőteljesen metilálta a kanonikus CG szubsztrátot is (Bsh1236I emésztés).

Ezt követően irányított enzimevolúcióval próbáltuk a $\Delta A323+N324G+E305A$ hármas mutáns nem-CG specifikitását növelni és CG specifikitását csökkenteni. A kódoló gén egy hosszabb szakaszát (460 bp) mutagenizáltuk az error-prone PCR (EP-PCR) technikával. A mutagenizált génszakasz magába foglalta az enzim teljes kis doménjét (benne a TRD-vel) kódoló

részt. Az EP-PCR eredményeként egy ~60 000 klónból álló plazmidkönyvtárat kaptunk, melyben az egyes klónok átlagosan 2-3 pontmutációt tartalmaztak. A nem-CG helyeket metiláló mutánsok szelektálása céljából az indukált sejt kultúrából izolált plazmidkönyvtárat az Eco47I restrikciós endonukleázzal emésztettük meg (az Eco47I általi emésztést a CH metiláció gátolja). Az emésztési elegy újratranszformálásával egy olyan klónt ($\Delta A323+N324G+E305A+R326G$) nyertünk, mely a hármas mutánshoz képest kissé megnövekedett aktivitást mutatott a CC helyeken, miközben a kanonikus CG helyek metilációja jelentősen csökkent. A két munka során talált előnyös mutációk (**E305N** és **R326G**) kombinálásával létrehoztuk a $\Delta A323+N324G+E305N+R326G$ négyes mutánst. Az affinitáskromatográfiával tisztított enzim radioaktív metilcsoport beépülésén alapuló mérések alapján mintegy 10-szer gyorsabban metilálta a CC szubsztrátot, mint a kanonikus CG dinukleotidot. Az *in vitro* mérési eredményeket az *in vivo* plazmidvédeltségi tesztek is megerősítették: úgy tűnt, hogy egy CC specifikus C5-MTázt sikerült izolálnunk.

Kíváncsiak voltunk arra, hogy a CC helyet határoló nukleotidok befolyásolják-e a metiláció hatékonyságát. A méréseket *in vitro* végeztük a radioizotópos módszerrel. Szubsztrátnak olyan

duplaszálú oligonukleotidokat használtunk, melyek csak a CC helyet határoló nukleotidokban különböztek egymástól. Az összes NCCN variáció lefedéséhez 16 oligoduplexre volt szükségünk. A mérési eredmények alapján a határoló nukleotidok valóban jelentősen befolyásolják a CC metiláció hatékonyságát. A legjobb (TCCA) és a legrosszabb szubsztrát (TCCT) között mintegy 150-szeres különbséget mértünk a beépült radioaktivitásban. Azok a CC helyek, melyeket a 3' oldalon A vagy C határolt, jó szubsztrátjai voltak az enzimnek, míg az ebben a pozícióban T-t vagy G-t tartalmazók rossz szubsztrátok voltak. Az 5' oldali határoló nukleotidok hatása kevésbé volt jelentős, ebben a pozícióban az A jelenléte volt a legkedvezőtlenebb. Ez a markáns határoló nukleotid-preferencia *in vivo* plazmidvédelességi teszttel is kimutatható volt. Összefoglalva, a $\Delta A323+N324G+E305N+R326G$ négyes mutáns egy olyan CC specifikus C5-MTáz, mely jelentős preferenciát mutat a CCA és CCC helyek iránt.

Az értekezés 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.

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.

Társszerzői nyilatkozat

Alulírott Varga Bence nyilatkozom, hogy a Jelölt, mint társszerző hozzájárulása a megnevezett közleményhez jelentős volt. Kijelentem, hogy a közleményben foglalt eredményeit tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, és a jövőben sem fogom felhasználni.

Szeged, 2024. 02. 27.

Varga Bence