

# **SssI DNS metiltranszferáz által katalizált citozin dezamináció**

Ph. D. értekezés tézisei

**Stier Ildikó**

Témavezető: Dr. Kiss Antal

SzTE-TTIK, Biológiai Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

Szeged, 2013

## Bevezető

A DNS metiláció az epigenetikai szabályozás egy kulcsfontosságú eleme, amely baktériumoktól emlősökig számos élőlényben megfigyelhető. Az N6-metiladenin, N4-metilcitozin és C5-metilcitozin a DNS természetes alkotóelemei, a nagy árokban elhelyezkedő metil csoport ugyanis nem változtat a bázisok Watson-Crick bázispárosodási képességein, de a DNS-t felismerő enzimek számára új információval bír.

Eukarióták genomjában kizárólag C5-citozin metiláció figyelhető meg, mely emlősöknél főként a CpG dinukleotidokban található citozinokat érinti. A reakciót a C5-citozin metiltranszferázok katalizálják, melyek egy aktivált metilcsoportot juttatnak a citozin ötös szénatomjára S-adenozil-L-metionint (SAM) használva donorként. A metilált citozinok térbeni és időbeni eloszlása nem véletlen, hanem egy jól meghatározott mintázatot követ. Ennek helyes kialakítása és fenntartása elengedhetetlen a szervezet normális fejlődéséhez és működéséhez. A rendellenes metiláció számos kórképpel, így neurodegeneratív betegségekkel, cukorbetegséggel, rákkal illetve az öregedéssel is összefüggésbe hozható. A DNS-metilációt vizsgáló epigenetikai kutatásoknak nagy jelentősége van nemcsak adott betegségek diagnosztizálásában, de az esetleges gyógymódok kidolgozásában is, így napjainkban nagy hangsúlyt kaptak azok a kutatások, amelyek megkísérlik bizonyos gének metilációs profiljának összekapcsolását az adott gén szövet-specifikus kifejeződésével. Számos módszer létezik a globális illetve a génspecifikus metilációs mintázat megállapítására, melyek közül a legelterjedtebb az ún. biszulfitos DNS szekvenciameghatározás. A módszer azon a megfigyelésen alapszik, hogy egyszálú DNS-ben a nátrium-hidrogénszulfid, vagy biszulfid, sokkal gyorsabban képes dezaminálni a citozint uracillá egy dihidrocitozin-szulfonát intermedier kialakulásán keresztül, mint ahogy azt az 5-metilcitozinnal teszi. A módszer egy nagy hátránya, hogy a reakció során használt körülmények (hosszú inkubációs idő, magas hőmérséklet és alacsony pH) esetenként a vizsgálni kívánt DNS degradációjához, és így az eredmény megbízhatatlanságához vezethetnek.

Egyes prokarióta metiltranszferázokról és az eukarióta Dnmt3a metiltranszferáz katalitikus alegységéről kimutatták, hogy metildonor hiányában képes a célszekvencián belül található citozint uracillá dezaminálni. Az enzimatisz citozin dezamináció feltehetően a metiláció során is létrejövő 5,6-dihidro-citozin intermedier kialakulásán alapszik, és a biszulfid konverzióhoz hasonlóan megy végbe. Az SssI citozin-metiltranszferáz az egyetlen olyan prokarióta enzim, mely az emlősökben található C5-MTázokhoz hasonlóan a CpG

szekvenciákon belüli citozint módosítja, így jól alkalmazható modellként és kísérleti eszközként a magasabb rendű eukariótákban előforduló citozin metiláció tanulmányozásában. Az M.SssI által katalizált dezaminációra vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak: néhány cikk arról számol be, hogy az M.SssI képes a citozin sőt az 5-metilcitozin dezaminációjára is, míg egy másik tanulmányban ezt nem tudták igazolni.

## Célkítűzés

A biszulfít konverzió és a metiltranszferázok által katalizált citozin dezamináció közti hasonlóságból kiindulva doktori munkám során főként arra voltunk kíváncsiak, hogy felhasználható-e az M.SssI az epigenetikailag fontos CG dinukleotidokban található metilált és metilálatlan citozin megkülönböztetésére. A munkát az motiválta, hogy a biszulfitos konverzió enzimatikus reakcióval való helyettesítése kiküszöbölhetné a reakció használatát gyakran nehezítő egyes technikai problémákat. Ezzel kapcsolatban a következő kérdésekre kerestük a választ:

- Képes-e az SssI MTáz katalizálni a citozin dezaminációját? Ez a kérdés azért volt indokolt, mert az irodalomban erre vonatkozóan ellentmondásos adatok voltak.
- Képes-e az SssI MTáz katalizálni az 5-metilcitozin dezaminációját?
- Találunk-e olyan reakciókörülményeket, amelyek között az M.SssI által katalizált citozin és 5-metilcitozin dezamináció sebességeinek különbsége eléri a biszulfitos konverzióban mutatott különbséget?
- Tudunk-e olyan körülményeket teremteni, hogy az SssI MTáz *in vivo*, SAM jelenlétében is mutasson citozin dezaminációt?

Az M.SssI-el végzett munka során egy véletlen megfigyelés következtében észrevettük, hogy a CG metiláció új szubsztráthelyeket teremt az MvaI restriktív enzim számára. Ezek az új hasítóhelyek különböztek az MvaI ismert CCWGG (W lehet A vagy T) szubsztráthelyeitől, így célul tűztük ki ezen új, metiláció-függő szubsztráthelyek azonosítását illetve a hasítás mechanizmusának tisztázását. Az új felismerési helyek azonosítása fényt derített az MvaI endonukleáz egy eddig nem ismert aktivitására.

## Alkalmazott módszerek

- Rekombináns-DNS módszerek, plazmidkonstrukciók létrehozása
- Aminosavsztitúciókat hordozó fehérjék létrehozása irányított mutagenezissel
- Fehérjetermelés vizsgálata immunoblotal és tisztítás affinitáskromatográfiával
- Metiltranszferáz aktivitás mérés *in vivo* és *in vitro*
- Mutációs ráta mérés
- DNS-szekvencia analízis
- Oligonukleotidok radioaktív jelölése és phosphor-image analízis
- Statisztikai tesztek

## Eredmények

Az M.SssI által katalizált dezamináció vizsgálatához felhasznált pUP41 plazmid egy mutáns kanamicin-rezisztencia gént tartalmaz, amelyben egy aminosavsztitúció kanamicin szenzitív fenotípust eredményez. A mutáns kodon egy SmaI restrikciós enzim felismerési helyben (CCC/GGG) található. Az aláhúzással jelzett citozin timinre cserélődése visszaállítja az eredeti kodont, és így a kanamicin rezisztenciát. Mivel az aláhúzással jelzett citozin része az SssI metiltranszferáz felismerési helyének (CG), a pUP41 felhasználható szubsztrátként az M.SssI által katalizált citozin dezamináció vizsgálatára. A citozin dezaminációja következtében uracil, és így hibás U:G bázispár jön létre, amely ha javítatlan marad, végül C→T mutáció megjelenését eredményezi a DNS replikáció során. Ez a citozin-timin csere ugyanakkor az adott SmaI hely eltűnését, és egy új BstNI (MvaI), azaz CC/WGG felismerési hely megjelenését eredményezi.

Az irodalmi adatok egy részét alátámasztva kimutattuk, hogy a metildonor hiányában az M.SssI valóban képes a citozint uracillá dezaminálni, és a reakció egy SAM analóg, az 5'-amino-5'-dezoxiadenozin (AA) hozzáadásával mintegy tízszeresére gyorsítható.

Egyszálú DNS-ben a biszulfít által indukált C→U konverzió ~ötvenszer gyorsabb, mint az ugyanilyen körülmények közt megfigyelhető <sup>m5</sup>C→T dezamináció. Összehasonlítva a kettős szálú DNS-ben található citozin és 5-metilcitozin nukleotidok M.SssI által katalizált dezaminációjának sebességeit kimutattuk, hogy 5'-amino-5'-dezoxiadenozin jelenlétében ez utóbbi legalább százszor lassúbb. Ez azt sugallja, hogy az M.SssI általi konverzió elég

érzékeny ahhoz, hogy megbízhatóan megkülönböztesse a metilálatlan és metilált citozinokat. Mindemellett eredményeink azt mutatják, hogy az M.SssI által katalizált reakció jóval lassúbb folyamat, mint az általánosan használt körülmények közt végbemenő biszulfitos konverzió, így jelen formájában nem alkalmas a gyakorlati használatra.

Az *in vitro* vizsgálatok mellett arra is kíváncsiak voltunk, hogy az SssI metiltranszferáz felhasználható-e citozin dezaminációra *in vivo*, SAM jelenlétében. Ennek vizsgálatára létrehoztunk két mutáns enzimet. A C5-citozin metiltranszferázok közt erősen konzervált, feltehetőleg a SAM kötésében szerepet játszó I. motívum Phe17 és Gly19 aminosavait helyspecifikus mutagenezissel szerinre illetve aszparaginsavra cseréltük. Az aminosavsztitúciók a metildonorhoz való affinitás csökkentése révén, az alacsony SAM koncentráció során fellépő körülményeket voltak hivatva utánózni *in vivo*. A létrehozott M.SssI(F17S) és M.SssI(G19D) mutáns enzimek dezaminációs aktivitását két különböző *E. coli* gazdában is megvizsgáltuk. Az egyik esetben az *sssIM* allél és a célzott mutáns kanamicin-rezisztencia gén (*kanS*) két különböző plazmidon voltak, míg a másik gazdánál a *kanS* gén a kromozómán volt. A G19D enzimvariáns mindkét, uracil-DNS glikozilázal (Ung) nem rendelkező gazda esetén ~tízszeresére növelte a citozin dezamináció sebességét, míg a WT enzim és az F17S mutáns esetén nem tapasztaltunk hatást. A megnövekedett C→U mutációs rátát fluktuációs teszttel is igazoltuk. Érdekes módon az M.SssI(G19D) mutáns Ung<sup>+</sup> gazda esetén is megnövekedett dezaminációs rátához vezetett, ami azt sugallja, hogy az enzim képes az uracil-DNS glikozilázhoz kapcsolt javítás gátlására. A mutánsok csökkent SAM kötő képességét az is alátámasztotta, hogy mind *in vivo* mind *in vitro* alacsonyabb metiltranszferáz aktivitással rendelkeztek, mint a vad típusú enzim.

A CG-specifikus M.SssI metiltranszferázzal végzett munka során észrevettük, hogy az M.SssI általi *in vivo* vagy *in vitro* metiláció új szubsztráthelyeket teremt az MvaI restriktív enzim számára. Az új felismerési helyek megjelenése a CG-metilációtól függött, és az MvaI endonukleázra specifikus volt, az enzim egy izoszkizomerje, a BstNI, nem ismerte fel őket.

Az MvaI restriktív enzim kanonikus felismerési helye a 5'-CC↓AGG/5'-CC↑TGG szekvencia, melyet a nyilaknak megfelelően, monomerként hasít. Az enzim RM rendszerbeli társa, az MvaI MTáz, a felismerési szekvencia második citozinját metilálja N4 pozícióban (C<sup>m4</sup>CAGG/C<sup>m4</sup>CTGG). A kanonikus hely citozinjainak C5-metilációja nem jelent védelmet a hasítással szemben. Kimutattuk, hogy az MvaI restriktív enzim a kanonikus kettőszálú hasítás mellett a metilált BcnI helyek (C<sup>m5</sup>C↓GGG/CC<sup>m5</sup>CGG) egyszálú hasítására (nick) is

képes, a nyíllal jelölt pozícióban. A  $CC^{m5}C\downarrow GGG/CC^{m5}C\uparrow GGG$  szekvenciáknál (CG-metilált SmaI hely), ahol két ellentétes irányú metilált BcnI hely átfedő módon egymás mellé kerül, a metiláció-függő aktivitás kétszálú hasítást eredményez, ahogy a nyilak jelzik. A hasítás sebessége és a felismerés specifikussága ezeken a helyeken alacsonyabb, mint az enzim kanonikus aktivitása esetén.

Az MvaI az első példa arra, hogy egy restriktív enzim kettős specificitással rendelkezhet, azaz a “szokásos” II. típusú endonukleázokra jellemző metilátlan felismerőhely mellett egy attól eltérő szekvenciájú meghatározott módon metilált helyet is hasít. Az MvaI metiláció-függő aktivitása egyszerre jelent egy- és kettőszálú specificitást ( $C^{m5}C\downarrow GGG/CC^{m5}CGG$  és  $CC^{m5}C\downarrow GGG/CC^{m5}C\uparrow GGG$ ), melyek eddig ismeretlenek voltak.

## Eredmények röviden

- Kimutattuk, hogy metildonor SAM hiányában az M.SssI képes a CG szekvenciákban található citozint uracillá dezaminálni és egy SAM analóg, az 5'-amino-5'-deoxiadenozin nagymértékben gyorsítja ezt a reakciót.
- Kimutattuk, hogy a citozin és 5-metilcitozin a biszulfid konverzióhoz hasonlóan, eltérő érzékenységet mutat az M.SssI által katalizált dezaminációval szemben is.
- Eredményeink azt mutatják, hogy az M.SssI által katalizált citozin dezamináció, az alacsony reakciósebesség miatt, jelenleg nem alkalmas a gyakorlati felhasználásra. Az általunk létrehozott *E. coli*-KanS törzs azonban lehetőséget ad irányított evolúciós módszerek alkalmazására és egy jobb dezaminációs képességekkel rendelkező enzimvariáns létrehozására.
- Kimutattuk, hogy az F17S és G19D aminosavszubsztitúciók a metiltranszferáz aktivitás erős csökkenéséhez vezetnek és a G19D mutáns enzim fokozott C→U dezaminációs aktivitással rendelkezik *in vivo*, SAM jelenlétében. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az enzimet irányított C→T mutációk létrehozására használjuk *in vivo*.
- Kimutattuk, hogy az MvaI endonukleáz egy kettős specificitással rendelkező restriktív enzim, mely a metilátlan felismerőhely mellett egy attól eltérő szekvenciájú másik helyet is hasít, amennyiben az meghatározott módon metilált. Az

MvaI-nek ezt a tulajdonságát figyelembe kell venni CG-specifikusan metilált DNS, így pl. emlős DNS emésztésekor. Az MvaI metiláció-függő aktivitása új hasítási specifikitást jelent, amely bővíti a DNS-kutatás eszköztárát.

## **Közlemények**

Stier I., Kiss A. (2010): **The Type II restriction endonuclease MvaI has dual specificity** - Nucleic Acids Research 38: 8231-8238.

I.F. 7,836

Stier I., Kiss A. (2013): **Cytosine-to-Uracil Deamination by SssI DNA Methyltransferase** - PLOS One 8(10): e79003. doi:10.1371/journal.pone.0079003

I.F. 3,730