

**Megváltoztatott szekvenciaspecifitású DNS
metiltranszferázok létrehozása és vizsgálata**

Ph.D értekezés tézisei

Tímár Edit



**Témavezetők: Dr. Venetianer Pál,
emeritus professzor**

**Dr. Kiss Antal, tudományos tanácsadó
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont**

Biológia Doktori Iskola

SzTE TTIK

2016

Szeged

Bevezetés

A II. típusú modifikációs enzimek ideális kísérleti objektumok a szekvencia-specifikus DNS-fehérje kölcsönhatások tanulmányozására. Ezek az enzimek 2-8 bp hosszú DNS szekvenciákat ismernek fel, és nagy pontossággal metilálják azokat. A metiltranszferázok egy csoportja, a C5-citozin metiltranszferázok szerkezete nagyon hasonló felépítést mutat. A C5 metiltranszferázok aminosavsorrendjeinek összehasonlításából kiderült, hogy ezek az enzimek 10 konzervált motívumból épülnek fel, melyek mindig azonos sorrendben követik egymást. A motívumokból 6 erős, 4 pedig gyengébb konzerváltságot mutat. A VIII. és IX. szekvenciareész között egy változó hosszúságú, és aminosavösszetételű, úgynevezett variábilis régió található. Ez a felépítés azt sugallja, hogy a konzervált motívumok felelősek az általános enzimatis reakciókért, a variábilis régió pedig a szekvenciaspecifitás meghatározója. Ennek dacára a szekvenciaspecifitás megváltoztatása a csak a variábilis régiók cseréjével sikertelen volt a monospecifikus metiltranszferázokkal végzett kísérletekben. Két esetben írtak le olyan kiméra enzimeket, amelyeknél a variábilis régió szekvenciaspecifitást meghatározó voltát igazolták (Klimasauskas et al., 1991), (Mi and Roberts, 1992). A Hhal (Cheng et al., 1993) és HaeIII (Reinisch et al., 1995) enzimek három-dimenziós szerkezeti adatai szintén megerősítették a variábilis régió szekvenciaspecifitást meghatározó szerepét. Az adatokból kiderült, hogy ezek az enzimek egy nagy, és egy kisebb doménből állnak, és a két domén által formált

árokban történik a szekvenciaspecifikus DNS kötés. Mindkét esetben a röntgendiffrakciós adatok azt mutatták, hogy a nagy domén tartalmazza a legtöbb konzervált motívumot, és a DNS kis árki felszínével lép kapcsolatba, míg a kis domén alkotásában a variábilis régió és a IX. motívum vesz részt, és a DNS nagy árki felszínével létesít kapcsolatokat. A munkacsoportunkban végzett kísérletek azonban kimutatták, hogy legalábbis két esetben, a SinI (GGWCC) és az EcoRII (CCWGG) enzimek esetén azon képesség, hogy a felismerőszekvencián belüli A/T, illetve G/C bázispárokat megkülönböztessék, a DNS kis árkával létesített interakciók révén valósul meg (Kiss et al., 2001). Ebből a megfigyelésből az következik, hogyha ezen enzimek felépítése hasonló a HhaI, és HaeIII enzimekéhez, a specifikitást meghatározó elemek a nagy doménben találhatóak. A hipotézist alátámasztják a SinI metiltranszferázzal végzett random mutagenesis kísérletek. A mutagenesis során a SinI nagy C-terminális részét mutagenizálták, mely magában foglalja a variábilis régiót is. Két relaxált fenotípusú mutáns enzimet izoláltak (N172S és V173L aminosavcserék), melyek képesek voltak a felismerőszekvencián belüli A/T bázispárok mellett a G/C szekvenciákat is felismerni és metilálni. A mutációk nem a variábilis régióban helyezkedtek el.

Célkitűzés

Kísérleteink célja megváltozott szekvenciaspecifitással rendelkező SinI metiltranszferáz mutánsok előállítása volt. A SinI metiltranszferáz génjét random mutagenesisnek vetettük alá, majd a mutáns gének fragmentumainak újrendezését végeztük el a DNS keverés technika alkalmazásával. A random mutagenizált géneket plazmidvektorba klónoztuk, és

erős *in vitro* szelekciót alkalmaztunk, GGCC specifitású endonukleázzal emésztést végeztünk.

A dolgozat másik részében a régebben (Kiss és mtsai, 2001) és a jelenlegi kísérletek során izolált megváltozott szekvenciaspecifitású mutáns SinI metiltransferázok *in vivo* vizsgálatát végeztük. A kísérletek során azt kívántuk tesztelni, vajon a megváltozott specifitású enzimek milyen mértékben képesek védelmet nyújtani a baktériumsejteknek egy GGCC specifitású endonukleázzal szemben.

Alkalmazott módszerek

- PCR technikák (mutagenézis, DNS keverés)
- Rekombináns DNS technikák plazmidkonstrukciók létrehozására
- Baktériumsejtek transzformálása
- Fehérje tisztítás
- Egyensúlyi enzimkinetikai paraméterek meghatározása
- DNS szekvencia analízis

Eredmények

A mutáns M.SinI gén izolálása

A random mutagenézis, a DNS-keverés, és akívánt fenotípusra irányuló erős szelekció alkalmazásával izoláltunk egy mutáns SinI enzimet, amely a GGCC szekvenciák mellett a GGSCC szekvenciákat is képes volt nagymértékben metilálni. A mutáns gén kilenc pontmutációt tartalmazott, öt mutáció (C101T, A130C, T197C, T641C és T685C) aminosavcsere eredményezett (A34V, K44Q, M66T, L214S és Y229H). Egyetlen mutáció sem volt a variábilis régióban, három ezek közül az enzim N-terminális

részen, az I. konzervált motívum előtt, kettő pedig a molekula belső részén, a VI. és VII. konzervált régió közötti részben található. Megállapítottuk, hogy a megváltozott szekvenciaspecifitásért a VI. és VII. régiót összekötő régióban elhelyezkedő mutációk a felelősek, az N-terminális részben található mutációk hozzájárulása a megváltozott fenotípushoz minimális. A csak a két belső mutációt (L214S, Y229H) hordozó enzimet közel homogenitásig tisztítottuk, steady-state kinetikai paramétereit meghatároztuk. A mutáns enzim (M.SinI L214S + Y229H) k_{cat}/K_m értéke 4.5-ször alacsonyabb az eredeti GGWCC szubsztráttal, mint a vad típusú enzim hasonló értékei. Ez a változás a k_{cat} érték csökkenésének köszönhető. A mutáns enzim k_{cat}/K_m értéke kb hússzor magasabb volt a GGSCC szubsztráttal, összehasonlítva a vad típusú enzimmel. A mutáns K_m értéke ezzel a szubsztráttal 2-szer magasabb volt, mint a vad típusú enzimé, de k_{cat} értékének 40-szeres növekedése kompenzálta a hiányt.

A mutáns SinI metiltranszferázok nyújtotta védelem egy szabályozható expressziójú GGNCB specifikus endonukleázzal szemben

A restrikciós-modifikációs rendszerekben a modifikációs metiltranszferázok feladata a sejtben a gazdasejt DNS-ének megvédése a saját endonukleázától. Kísérleteink során azt vizsgáltuk, vajon a korábban (N172S, és V173L), valami a doktori munkám során izolált (A34V, K44Q, M66T, L214S és Y229H) mutáns SinI metiltranszferázok képesek-e védelmet nyújtani a baktériumsejteknek egy olyan endonukleázzal szemben, mely mind a GGWCC, mind a GGSCC helyeket képes hasítani. A munka során egy *in vivo* tesztrendszert használtunk, amelyben a mutáns SinI metiltranszferázokat együtt expresszáltattuk a

szabályozható expressziójú GGNCC specifikus Sau96I endonukleázzal. Létrehoztuk egy olyan plazmidot, ahol a Sau96I endonukleáz transzkripciója az araBAD promoter irányítása alatt állt. Ebben a konstrukcióban a Sau96I endonukleáz génjének transzkripciója glükózzal represszálható, arabinózzal pedig indukálható, de Sau96I metiltranszferázt nem hordozó baktériumsejtekben letális, még glükóz jelenlétében is. DH10B *E. coli* baktériumsejteket egyszerre három különböző plazmiddal transzformáltunk. A plazmidok a következők voltak:

- vad és a mutáns metiltranszferázokat (N172S, V173L, illetve 5 aminosavcserés mutáns) hordozó plazmidok.
- a szabályozható expressziójú endonukleázt tartalmazó (pOB-R.Sau96I),
- valamint a pJAT13araE plazmidok.

A pJAT13araE plazmidról konstitutívan expresszálódik az arabinóz transzporter. Azért használtuk ezt a plazmidot, hogy a baktériumtenyészet minden egyes sejtjében az arabinózkoncentráció függvényében azonos legyen a transzkripció intenzitása. A különböző (vad és mutáns) metiltranszferázokat hordozó baktériumsejtek életképességét megállapítottuk glükóz, és különböző mennyiségű arabinózt tartalmazó lemezekon. A három plazmidot tartalmazó baktériumsejteket glükóz jelenlétében tápfolyadékra növesztettük, majd különböző hígítású baktériumkultúrákat szélesztettünk 0.01% arabinózt tartalmazó lemezek felületére, és megállapítottuk az élősejtszámot. Ebben a kísérletben az N172S, és a V173L mutáns metiltranszferázokat tartalmazó baktériumsejtek életképessége ötször magasabb volt, mint a vad, és az 5 aminosavcserés SinI metiltranszferázt hordozó sejté, jelezvén, hogy az

N172S és V173L mutáns metiltranszferázok nagyfokú védelmet képesek nyújtani a baktériumsejteknek a Sau96I endonukleázzal szemben. Meglepő, hogy az 5 aminosavcserés mutánst hordozó plazmid GGSCC helyeinek metiláltsága hasonló volt a másik két mutánséhoz, mégis az életképességi tesztben a vad típussal azonos életképességet mutatott. Az N172S és a V173L aminosavcseréket hordozó mutáns metiltranszferázok képesek nagyfokú, de nem teljes védelmet nyújtani *in vivo* egy GGNCN specifikus endonukleázzal szemben. Igaz, az életképességi tesztben az arabinóz tartalmú lemezekben felnőtt kolóniákat továbboltva arabinózt tartalmazó lemezre, vagy tápfolyadékra, nem kaptunk növekedést, hiszen a GGSCC helyek nem tökéletes metiláltsága ebben a kísérletben nem elegendő a sejtek hosszú távú túléléséhez.

A DNS ligáz hatása

Az N172S és V173L mutáns metiltranszferázok nyújtotta védelem a Sau96I endonukleázzal szemben meglepő, hiszen ha a plazmidokon levő GGSCC helyek nem teljesen védettek (12. ábra), akkor a kromozómán levő 4218 GGSCC (Pósfai János személyes közlése) egy része is metilálatlan. Feltételeztük, hogy ez a védelem a DNS ligáznak köszönhető, amely képes a Sau96I endonukleáz okozta kettős szálú DNS törések javítására. Feltételezésünket két korábbi megfigyelésre alapoztuk (Heitman et al., 1989; Smith et al., 1992). Az elmélet tesztelésére, egy olyan plazmidkonstrukciót használtunk, amely hibrid restrikciós-modifikációs rendszert (pMSin-RSau, Ap) tartalmaz, a SinI metiltranszferázt, és a Sau96I endonukleázt. Ennek a

plazmidnak egy olyan változatát is elkészítettük, amely a SinI metiltranszferáz V173L mutáns allélját tartalmazza. A pOK-ligA (Kan) plazmid ezekkel kompatibilis, a DNS ligáz gént kódolja, saját promotérének irányítása alatt. A pMSin-RSau, és a pMSin(V173L)-RSau plazmidok a GGSCC helyek nem tökéletes metiláltsága miatt Sau96I metiltranszferázt kódoló plazmid (pSTC-M.Sau96I) mellett tarthattuk fenn stabilan. pMSin-RSau (Ap)/pSTC-M.Sau96I (Cm) plazmidokat tartalmazó ER1398 *E. coli* baktériumsejteket transzformáltunk pOK-ligA (Kan) plazmiddal. Sok különböző méretű Ap/Kan kettős rezisztens kolóniát kaptunk, ezek azonban továbboltva friss Ap/Kan tápfolyadékra, vagy lemezre nem voltak életképesek. 1000 transzformánsból csak kettő nőtt fel Ap/Kan tápfolyadékon, ezek a klónok azonban nem tartalmazták a Sau96I endonukleázt. A pMSin(V173L)-RSau, és pOK-ligA plazmidokkal transzformált baktériumsejtek esetén azonban a kettős rezisztens klónok 10%-a életképesen bizonyult, és valóban funkcióképes Sau96I endonukleázt tartalmazott.

Ezek az eredmények, valamint a korábbi megfigyelések egy általános ligáz-függő mechanizmust sugallnak, mely képes megmenteni az *E. coli* sejteket a klónozott endonukleáztól, minden olyan esetben amikor életképes r^+ m^- klónokat izoláltak. Legjobb tudásunk szerint, minden olyan kísérlet során, ahol életképes r^+ m^- klónokat izoláltak, a restriktív enzim túlnyúló véget eredményezett, amely ellentétben a tompa végekkel, szubsztrátja a DNS ligáz enzimnek.

Saját közlemények listája:

E Tímár, G Groma, A Kiss, P Venetianer (2004) Changing the recognition specificity of a DNA-methyltransferase by in vitro evolution *Nucleic acids research* **32** (13), 3898-3903

E Tímár, P Venetianer, A Kiss (2008) In vivo DNA protection by relaxed-specificity SniI DNA methyltransferase variants *Journal of bacteriology* **190** (24), 8003-8008

K Ólaska-Kiss, E Tímár, A Kiss (2012) Complementation between inactive fragments of SssI DNA methyltransferase *BMC molecular biology* **13** (1), 1

B Csörgő, T Fehér, E Tímár, FR Blattner, G Pósfai (2012) Low-mutation-rate, reduced-genome *Escherichia coli*: an improved host for faithful maintenance of engineered genetic constructs *Microbial cell factories* **11** (1), 1

