

Ph.D. értekezés tézisei

**A restriktív endonukleáz működés bizonyos vonatkozásainak
vizsgálata: DNS felismerés és *in vivo* hatások**

Tetiana Ivanenko

Témavezető:
Kiss Antal

MTA Szegedi Biológiai Központ, Biokémiai Intézet
2002

Bevezetés

A PhD értekezés három, részben összefüggő munka eredményeit foglalja magába. Az első az *EcoRI* endonukleáz DNS-szubsztrátfelismerésének mutációs analízise. A második a restriktív enzimek egy *in vivo* hatásával foglalkozik. A harmadik, még befejezetlen munka annak a lehetőségét vizsgálja, hogy létre lehet-e hozni hibrid restriktív endonukleázokat és elemzi egy ilyen hibrid fehérjének a tulajdonságait. Mindhárom projekt közös témája a II. típusú restriktív enzimek szekvenciaspecifitása.

I. Az *EcoRI* endonukleáz DNS-szubsztrátfelismerése

Az *EcoRI* endonukleáz egyike a legjobban jellemzett restriktív enzimeknek és egyben egy gyakran használt biokémiai reagens is. Az enzim a GAATTC szekvenciát ismeri fel a kettősszalú DNS-ben és mindkét szálát hasítja a G és az A nukleotidok között. Az enzim a hasításhoz Mg^{++} -ot igényel, de a szubsztrátszekvenciához való kötődéshez Mg^{++} nélkül is képes. Enzimpárja, az *EcoRI* metiláz ugyanezt a szekvenciát ismeri fel, és a felismerőszekvencia mindkét szálán a belső adeninre átvisz egy metil csoportot. A metilált DNS rezisztens az *EcoRI* endonukleázzal szemben.

Az *EcoRI* endonukleáz két azonos, 277 aminosavat tartalmazó alegységből (MW = 31,063) álló homodimer. Az *EcoRI* endonukleáz volt az első II. típusú restriktív enzim, melynek DNS-sel alkotott komplexéről röntgen diffrakciós szerkezet készült. A kristályszerkezet alapján több olyan aminosavat lehetett azonosítani, amelynek feltehetően szerepe van a szekvenciaspecifikus DNS-felismerésben. A szekvenciaspecifitás molekuláris mechanizmusának alapos megértéséhez azonban szükség van a kristályszerkezetből adódó következtetések független módszerekkel való megerősítésére. A kontaktusok többségét – elsősorban a purinbázisok felismerésében szerepet játszókat – mások már vizsgálták genetikai és biokémiai módszerekkel. A pirimidinokkal való kölcsönhatások kevesebb figyelmet kaptak. A kristályszerkezet arra engedett következtetni, hogy a citozin felismeréséért három aminosav felelős: az aminocsoport H-kötéssel kapcsolódik az A138 főlánci karbonilcsoportjához, míg a H5 és

H6 van der Waals kapcsolatot képez az M137 és I197 oldalláncokkal. Az A138 szubsztrátfelismerésben játszott szerepét genetikai vizsgálatok is alátámasztották.

II. DNS egyszál-törések javítása *E. coliban*

Az *E. coli* sejtek sokféle DNS károsodás javítására képesek. A DNS károsodás egyik típusa az egyszál-törés (nick), amely első látásra kevésbé tűnik veszélyesnek, mivel az intakt szál összetartja a kétszálú szerkezetet.

Együttműködő partnerünk, J. Heitman izolálta az *EcoRI* endonukleáz E144C és R200K mutánsait. A mutánsok csökkent endonukleáz aktivitást, ugyanakkor vad típusú felismerőspecifitást mutattak. *In vitro* vizsgálva, mindkét mutáns olyan enzimnek bizonyult, mely az *EcoRI* helynek csak az egyik szálát hasítja és aktivitása hőérzékeny volt. Kimutatta, hogy ezek az *EcoRI* mutánsok indukálják az SOS választ és igen toxikusak RecA és RecB funkcióval nem rendelkező sejtekben. Ez egy igen meglepő megfigyelés volt és azt sugallta, hogy a DNS ligáz önmagában nem mindig képes kijavítani az egyszál-töréseket. Fontosnak látszott megvizsgálni, hogy ez a jelenség mennyire általános érvényű. Heitman vizsgálatait kiegészítendő, egy másik kísérleti rendszert választottunk a nickek létrehozására és hatásuk vizsgálatára. Ez a megközelítés Halford és munkatársainak eredményein alapult, akik megfigyelték, hogy ha az *EcoRV* endonukleáz egy m^+ gazdában túltermelik, az egyszál-töréseket hoz létre a felimerőhelyétől egy bázispárral eltérő szekvenciáknál.

III. Az *EcoRI* és az *RsrI* endonukleáz között szerkezeti és funkcionális hasonlóság van

Az *RsrI* endonukleáz az *EcoRI* endonukleáz izoschizomerje, a GAATTC szekvenciát ismeri fel és a G és A nukleotid között hasít. A szubsztrátszekvencia *EcoRI*-specifikus metilációja mindkét enzim hatása ellen véd. Hasonlóan az *EcoRI* endonukleázhoz, az *RsrI* is dimer és az aktivitáshoz Mg^{++} -ot igényel. A két enzim között 50 %-ot meghaladó aminosavszekvencia-azonosság van. Ennél még fontosabb, hogy valamennyi aminosav, amely az *EcoRI*-ben szerepet játszik a szubsztrátfelismerésben és katalízisben,

megőrződött az *RsrI*-ben is. Ez azt sugallja, hogy a két enzim ugyanolyan mechanizmussal ismeri fel a szubsztrátját.

Biokémiai vizsgálatok azt mutatták, hogy mindkét enzim egy 12 bázispárra kiterjedő footprintet ad, kb. 50° görbületet és kb. 25° kitekeredést idéz elő a kettősszálú DNS-ben. Ezekből a megfigyelésekből azt a következtetést vonták le, hogy a két enzimnek a felismerőszekvenciájával való kölcsönhatása hasonló. Más kísérletek különbségeket jeleztek. Így bázisanalógokkal végzett kísérletekben az *RsrI* érzékenyebbnek tűnt a felismerőszekvencián belüli funkcionális csoportok megváltoztatására, mint az *EcoRI*. A két enzim közötti szekvenciahomológia azt sugallta, hogy enzimaktivitással rendelkező hibrideket tudunk közöttük létrehozni. A hibridekkel a két enzim közötti szerkezeti és működésbeli hasonlóságot akartuk vizsgálni.

Kísérleti célok

- Az *EcoRI* endonukleázban az M137 és I197 aminosav szerepének vizsgálata helyspecifikus mutagenézissel és a mutánsok fenotípusának elemzésével.
- Restriktív enzimek által kiváltott DNS egyszál-törések javításának vizsgálata.
- *EcoRI-RsrI* rekombináns endonukleázok létrehozása.

Eredmények és következtetések

I. Az *EcoRI* endonukleáz DNS-szubsztrát felismerése

- *Helyspecifikus mutagenézis*

Kísérleti rendszerünkben az *EcoRI* endonukleáz és metiláz génje két kompatibilis plazmidon (pJH15b^{TS6} ill. pJC11) volt. Oligonukleotidok segítségével mutációkat hoztunk létre az *EcoRI* endonukleáz génben, az M137 ill. I197-es aminosavaknak megfelelő helyen. A mutánsok – hasonlóan a pJH15b^{TS6} plazmid által kódolt *EcoRI*^{TS6} mutánsához – hőérzékenyek voltak, ez lehetővé tette hatásuk vizsgálatát *EcoRI* metilázt nem tartalmazó sejtekben is. Az *EcoRI* endonukleáz aktivitásra a fágrestriktív, a sejt élőszám, valamint az SOS indukció meghatározásából következtettünk.

- *M137 szubsztitúciók*

Nyolc mutánst jellemeztünk: G, A, V, W, R, P, T, K

- a) Egyetlen mutáns sem mutatott restrikciót.
- b) Egyetlen mutáns sejtmentes kivonatában sem tudunk *EcoRI* aktivitást kimutatni.
- c) Az M137G, A, V, és T mutánsok életképtelenek voltak az *EcoRI* metiltranszferáz nélkül, tehát ezek a mutáns enzimek endonukleáz aktivitással rendelkeztek és DNS károsodást idéztek elő. Az M137R mutáns nagyon lassan nőtt, sötétkék telepet adott X-gal indikátor lemezen, amely az SOS választ jelezte. Az M137W, P és K mutánsok inaktívak voltak.

- *I197 szubsztitúciók*

Tíz mutánst jellemeztünk: V, L, M, G, Q, A, W, R, D, P.

- a) Az L és M cseréknek nem volt hatásuk a fágrestrikcióra., míg a G, A, Q, R, W cserék 10 – 100-szoros csökkenést eredményeztek. Az I197D és P mutációk a restrikció teljes megszűnéséhez vezettek. Az I197V szubsztitúció 10-szeres restrikciónövekedést okozott.
- b) A sejtmentes kivonatokban mért *EcoRI* aktivitás nagyrészt követte a fágrestrikcióval kapott értékeket.
- c) Valamennyi mutáns életképtelen volt *EcoRI* metiláz nélkül.

Következtetések

- 1) Egyetlen M137 vagy I197 szubsztitúció sem vezetett megváltozott specifitáshoz.
- 2) Az M137 cserék esetében bekövetkező aktivitáscsökkenés megerősíti az M137-nek az enzimműködésben feltételezett szerepét.
- 3) Az I197 valószínűleg nem játszik közvetlen szerepet az *EcoRI* endonukleáz szubsztrátfelismerésében.

II. Az *EcoRV* endonukleáz által előidézett DNS egyszál-törések javítása RecA- és RecB-függő

Egy *EcoRV* endonukleáz túltermelő rendszer segítségével hoztunk létre DNS egyszál-töréseket *E. coli* DNS-ben *in vivo*. A rendszer két plazmidból állt, a pMetB az *EcoRV* metiláz, a pBSKSRVD pedig az *EcoRV* endonukleáz génjét hordozta. Az *EcoRV* endonukleáz kifejeződését a hőérzékeny (*ci857*) λ represszor szabályozta. Ismert volt, hogy ha az *EcoRV* endonukleáz nagy koncentrációban van jelen a sejtben, az enzim nickeket hoz létre a felismerőhelytől egy bázispárban eltérő, és a metilációval nem védett szekvenciáknál. Annak érdekében, hogy az egyszál-törések javításának mechanizmusát vizsgálhassuk, a pMetB és a pBSKSRVD plazmidokat bejuttattuk különböző DNS-javító funkciókban defektív, de egyébként izogénikus *E. coli* sejtekbe. Az *EcoRV* endonukleáz *in vivo* hatására a 30 és 42 °C-on mért élőszám összehasonlításából következtettünk.

- a) A vad típusú baktérium és a *recN262* mutáns hasonló élőszámot mutatott mindkét hőmérsékleten, amely azt jelezte, hogy egyik sem volt érzékeny a megnövekedett *EcoRV* aktivitásra. Ezzel szemben, a *recA56* és a *recB21* mutáns törzsek életképessége legalább 5 nagyságrenddel alacsonyabb volt 42 °C-on, mint 30 °C-on. Azok a baktériumok, melyek csak pMetB plazmidot, vagy a pMetB-t és egy inaktív *EcoRV* endonukleáz mutánst termelő plazmidot tartalmaztak, ugyanolyan életképességet mutattak mindkét hőmérsékleten.
- b) A *lexA3* mutáns lassabban nőtt és megváltozott telep morfológiát (egyenlőtlen telepnagyság, szabálytalan telepszél és telepforma) mutatott 42 °C-on. Ez azt jelezte, hogy az *EcoRV* endonukleáz túltermelés toxikus volt *lexA3* mutáns sejteknek.

Megvizsgáltuk, hogy az *EcoRV* által kiváltott DNS károsodás megakadályozható-e a DNS ligáz aktivitás növelésével. Élőszámmeghatározást végeztünk olyan sejtekkel, melyek a pBSKSRVD plazmid mellett a pMetBLG1 plazmidot tartalmazták. Ez utóbbi abban különbözött a pMetB-től, hogy hordozta az *E. coli* DNS ligáz génjét is.

- a) A megnövelt ligáz aktivitás mellett az *EcoRV* túltermelés nem volt letális sem a *recA56*, sem a *recB21* sejteknek.

- b) A ligáz aktivitás növekedésének jótékony hatása megfigyelhető volt a *lexA3* gazda fenotípusából is: a törzs normális (a kontrollra jellemző) növekedési sebességet és telepmorfológiát mutatott.

Következtetések

- 1) Az *EcoRV* endonukleáz által előidézett DNS egyszál-törések javítása RecA és RecB funkciót igényelt és - legalábbis részben – függött az SOS választól.
- 2) A nickek mennyisége és a ligázkapacitás közötti egyensúlytól függ a nickek javításának mechanizmusa.
- 3) Az *EcoRV* által kiváltott DNS egyszál-törések káros hatása és a javítás mechanizmusa a Kuzminov modellel magyarázható.

III. *EcoRI-RsrI* rekombináns endonukleázok előállítása

Öt *EcoRI-RsrI* hibrid fehérjét állítottunk elő úgy, hogy az *ecoRIR* gén egyes darabjait az *rsrIR* gén megfelelő, PCR-rel szintetizált darabjaival helyettesítettük. A darabokat az *ecoRIR* génben lévő három egyedi restrikciós hasító hely (*HindIII*, *BglII*, *PstI*) határozta meg. A kiméra-fehérjéket a szerkezetüket tükröző betűszóval neveztük el: EREE, EERE, ERRE, REEE, EEER (E, *EcoRI*-eredetű, R, *RsrI*-eredetű darab).

- *Az EcoRI-RsrI rekombináns fehérjék in vivo jellemzése*
- a) Az ERRE, REEE, EEER és EREE fehérjék inaktívnak bizonyultak annak alapján, hogy *E. coli* JH140 sejtek, amelyek tartalmazták a hibrid endonukleáz génjét hordozó plazmidot, de nem termeltek *EcoRI* metilázt, a kontrollhoz hasonló életképességet mutattak.
 - b) Az EERE fehérjét termelő sejtek csak akkor voltak életképesek, ha *EcoRI* metilázt is termeltek. Ez arra utalt, hogy az EERE fehérje endonukleáz aktivitással rendelkezett.

- *Az EERE hibrid fehérje in vivo jellemzése*

- a) Az EERE fehérje hőmérséklet-érzékeny fenotípust mutatott, ami megkönnyítette az *in vivo* jellemzést.
- b) Az EERE termelődés indukálta az SOS választ.
- c) A fehérje által kiváltott hatást más törzsekben is megvizsgáltuk. *E. coli* RR1-ben, mely egy K12/B hibrid törzs, az EERE kifejeződés letális volt 30 °C-on, míg az *EcoRI*^{TS6} (ennek az *EcoRI* variánsnak a génjét használtuk a hibrid fehérjék előállításához), bár lelassította a növekedést, nem okozott lényeges csökkenést az élőszámban. A HB101 törzs (az RR1 *recA* változata) érzékenyebbnek bizonyult, mint az RR1. Ez azt sugallta, hogy az EERE által okozott DNS károsodás javításához rekombinációra van szükség.
- d) *recA56*, *recB21* és *lexA3* törzsek érzékenyebbek voltak az EERE fehérjére, mint az izogénikus vad típusú törzs.
- e) Az EERE fehérjét termelő sejtek nem mutattak restrikiót λ_{vir} fággal. Ez érvényes volt a fehérjét túltermelő sejtekre is.
- f) Vizsgáltuk a sejt DNS degradációját és az élősám változását olyan sejtekben, melyek EERE-t, ill. *EcoRI*^{TS6} fehérjét termeltek. Az élősám a két tenyészetben kb. egyformán, meredeken csökkent. Az *EcoRI*^{TS6} fehérjét termelő sejtek DNS-e jelentős degradációt mutatott, míg az EERE-t termelő sejtek DNS-e jóval kisebb mértékben volt degradált.

- *Az EERE hibrid fehérje in vitro jellemzése*

- a) 30 °C-on tenyésztett JH140 (EERE) és JH140 (*EcoRI*^{TS6}) sejtmentes kivonatában kerestünk restrikiós enzim aktivitást *EcoRI* és *RsrI* reakciópuffereket használva.
- b) Olyan körülmények között, amikor a JH140 (*EcoRI*^{TS6}) kivonat tízszeres hígítása a szubsztrátként használt λ DNS-t majdnem teljesen megemésztette, nem találtunk specifikus endonukleáz aktivitást a JH140 (EERE) kivonatában. Egy, az EERE fehérjét túltermelő plazmidot készítettünk a fehérje génjének a pER23S(-ATG) plazmidba klónozásával. Ebben a plazmidban az EERE gén az *rrnB* P₂ promoterről

íródik át. A fehérjét részlegesen tisztítottuk. A tisztítás során, a frakciókban endonukleáz aktivitást keresve, megfigyeltük, hogy a szubsztrátként használt (1 *EcoRI* helyet tartalmazó) pUC18 plazmid DNS gélelektroforetikus mobilitása egyes mintákban kisebb lett. Western blot analízissel kimutattuk, hogy az EERE fehérje azokban a frakciókban van, amelyekben a mobilitásváltozás észlelhető volt. Megállapítottuk, hogy az elektroforetikus retardáció csak *EcoRI* helyet tartalmazó plazmiddal következett be. Előzetes eredmények azt mutatták, hogy a részlegesen tisztított fehérje a supercoiled pUC18 és pUC19 plazmid DNS-t nagyon lassan képes volt hasítani.

Annak érdekében, hogy az EERE fehérjét affinitáskromatográfiával tisztíthassuk, két plazmidot (pET3-His-EERE és pFLAG-MAC-EERE) készítettünk. Ezek N-terminális affinitásfarokkal rendelkező EERE variánsokat kódolnak.

Következtetések

- 1) Az EERE hibrid fehérje által okozott DNS károsodás javítása homológ DNS rekombinációt igényel.
- 2) Az EERE fehérje *EcoRI*^{TS6}-hez viszonyított nagyobb toxicitása arra utalt, hogy az EERE által okozott DNS károsodás nem *EcoRI* hasítás.
- 3) Feltételezzük, hogy az EERE toxikussága a fehérjének az *EcoRI* helyekhez való nagyon erős kötődéséből, a transzkripció és/vagy a replikáció gátlásából ered.

Közlemények

1. Ivanenko, T., Heitman, J. and Kiss, A. (1998). Mutational analysis of the function of Met137 and Ile197, two amino acids implicated in sequence-specific DNA recognition by the *EcoRI* endonuclease. *Biological Chemistry*, 379: 459 – 465.
2. Heitman, J., Ivanenko, T. and Kiss, A. (1999). DNA nicks inflicted by restriction endonucleases are repaired by a RecA- and RecB-dependent pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33, 1141 – 1151.

Előadások és poszterek

1. Ivanenko, T., Heitman, J. and Kiss, A.: “Role of Met137 and Ile197 in sequence specific recognition by the EcoRI endonuclease” Second Molecular Biology Workshop of the Hungarian Biochemical Society, May, 1997, Lillafured, Hungary (talk).
2. Ivanenko, T., Heitman, J. and Kiss, A.: “Role of Met137 and Ile197 in sequence specific recognition by the EcoRI endonuclease” 4th New England Biolabs Workshop on Biological DNA Modification, September 2 – 7, Igls, Austria. (poster).
3. Ivanenko, T., Heitman, J., Kiss, A.: “Repair of ssDNA breaks inflicted by restriction endonucleases in *E.coli*”, Straub Days, January 20-22, 1999, BRC, Szeged, Hungary (talk).
4. Heitman, J., Ivanenko, T. and Kiss, A.: “DNA nicks inflicted by restriction endonucleases are repaired by a RecA – and RecB – dependent pathway in *Escherichia coli*” Howard Huges Medical Institute Meeting of International Research Scholars, June 22 – 25, 1999, Moscow, Russia, (talk).
5. Ivanenko, T., Heitman, J. and Kiss, A.: “Construction of hybrids between the EcoRI and RsrI restriction endonucleases” Howard Huges Medical Institute Meeting of International Research Scholars, June 20 – 23, 2000, Chevy Chase, Maryland, USA (talk).