

A munkatervben vállalt feladat lényegében az előző – hasonló című – OTKA pályázatunkban elért eredmények továbbfejlesztése és lezárása volt. E pályázatban ugyanis in vitro evolúciós stratégiával előállítottuk és jellemeztük egy DNS-modifikációs metiláz enzim megváltozott szekvensspecifitású mutánsát. A jelen munkában kitűzött cél több új hasonló típusú mutáns előállítása és jellemzése, az először jellemzett mutáns által felvetett néhány probléma megválaszolása, továbbá – amennyiben a vizsgált enzim térszerkezete tisztázódik – tervezett, megváltozott specifitású mutánsok előállítása lett volna. Ettől a munkatervtől – számos ok miatt – több ponton eltérünk.

Az újonnan létrehozott megváltozott specifitású mutánsok közül kettővel foglalkoztunk részletesebben. Az egyik a fehérje 172. pozíciójában lévő aszparagin helyett szerint (N172S), a másik a 176. pozícióban lizin helyett aszparagint (K176N) tartalmazott. Az előbbi (N172S) mutáns enzimet sikerült tisztítani, de az enzimkinetikai mérések értelmezhetetlenek voltak (rendkívül instabil volt az enzim). A másik mutáns enzimet, (K176N), amely nyers kivonatban a legnagyobb specifitásváltozást mutatta, nem sikerült homogenitásig tisztítani és az enzimkinetika mérések itt is nehezen értelmezhető, rendhagyó eredményeket adtak.

Munkánk során felmerült az a kérdés, hogy a SinI metiláz gén in vivo translációja valóban azon a ponton kezdődik-e, amelyet az irodalom állít és, amelyet korábban feltétel nélkül elfogadtunk. Ez azért vetődött fel, mert a SinI metiláz enzim N-terminális része (az I. homológ box előtti szakasz) jóval hosszabb, mint más hasonló szerkezetű enzimek megfelelő régiója és ezen a részen még két ATG (iniciátor) kodon fordul elő. Elkészítettünk tehát egy olyan deléciós mutánst, amely eltávolította az N-terminális régió elejét (a 30. aminosavig). Ezen a mutáns génen a transláció a (eredeti számozás szerinti) 66. aminosavnak megfelelő ATG kodonnál kezdődött. Ez a rövidített enzim in vivo, illetve nyers kivonatban mutatta a vad-típusú metiláz aktivitást, tisztítottuk is, de kinetikai elemzése ennek sem sikerült. Amikor ugyanezt a deléciót az elsőként izolált (az előző pályázati periódusban jellemzett) mutánsban (L214S, Y229H) állítottuk elő, ez a rövidített enzim nyers kivonatban a mutáns fenotípust mutatta (sőt a specifitásváltozás még erősebbnek tűnt, mint a teljes hosszúságú változatnál) de ez a mutáns enzim a sejten belül oldhatatlan zárványként jelent meg, tisztítása nem sikerült

Kitűzött céljaink között szerepelt „Az eddig előállított mutáns gének áthelyezése más, jobban szabályozható működésű vektorba...” Ezt a feladatot elvégeztük, a táptalajhoz adott arabinóz koncentrációjával finoman szabályozható működésű pBAD promotert tartalmazó vektorba vittük be a

vizsgálódó géneket. Ez az eredmény viszont felvetette azt az ötletet, hogy ez a vektor lehetőséget kínálna a megváltoztatott specifitású enzimek működésének in vivo kimutatására is. Erre az irodalomban tudomásunk szerint nincs példa. Az elgondolás lényege az volt, hogy a szabályozható pBAD promóterhez a Sau96I restriktív endonukleáz kódoló gént kapcsoljuk hozzá. Ha ez a gén (amely GGNCC szekvenciát hasít) működik, akkor megöli a kísérleteinkben használt E. coli gazdasejtet a SinI metiláz jelenlétében is, mert az endonukleáz ellen a vad-típusú SinI metiláz (amely csak a GGA/TCC szekvenciát metilálja) nem véd. Az általunk létrehozott mutáns metilázoknak azonban – feltételezésünk szerint – részleges, vagy teljes védelmet kell biztosítani a Sau96I endonukleáz ellen. Az endonukleáz aktivitás arabinóz általi szabályozásával pedig kvantitatíve jellemezhető a védelem mértéke. Ezen elgondolás alapján egy meglehetősen bonyolult – három különböző antibiotikumrezisztenciát hordozó, tehát szelektálható, plazmidvektoron alapuló – in vivo rendszert dolgoztunk ki, amely alkalmas volt arra, hogy különböző arabinózkoncentrációjú agarlemezekeken történő kolóniaszámlálással összehasonlítsa a módosult specifitású mutáns metilázok in vivo aktivitását. Ez sikerült is bár a—Az eredmény szépséghibája, hogy az in vivo és az in vitro eredmények nem kvantitatíve nem mindig korreláltak a különböző mutánsok esetében.:-

Befejezésül még egy – tanulságos – megfigyelésről érdemes beszámolni. Mutánsizolálási kísérleteink során több ízben szelektáltunk olyan klónokat, amelyek határozottan megváltozott specifitású fenotípussal rendelkeztek, de a gén szekvenálása csak ún. szinoním mutációk jelenlétét mutatta ki. Tekintve, hogy ezek az eredmények ellentmondani látszóttak a molekuláris biológia elfogadott tanainak, ezekkel az általunk „álmutánsnak” nevezett klónokkal nem foglalkoztunk tovább. 2006. decemberében azonban két olyan közlemény (Nackley et al. Science, 314, 1930-32, Kimchi-Sarfaty et al. Science, 315, 525-528) jelent meg az irodalomban, amelyek két különböző (eukaryota) kísérleti rendszerben egyértelműen bizonyították, hogy szinonim mutációk is vezethetnek megváltozott fenotípusú fehérjék kialakulásához (feltételezhetően a szinonim kodonnak megfelelő tRNS előfordulási gyakoriságának eltérése a vad-típusétól megváltoztatja a peptidlánc szintézisének sebességét és ez eltérő folding-kinetikát, így eltérő harmadlagos szerkezetet eredményez). Ezzel e kérdéssel tehát érdemes volna foglalkozni, én azonban jelen pályázat lejártával befejezettnek tekintem experimentális kutatói pályámat, tehát erre a feladatra már nem vállalkozom.