

## **DNS (citozin-C5) metiltranszferázok szubsztrátspecifitása**

A munkaterv gerincét az W (A:T vagy T:A) és az S (G:C vagy C:G) bázispárok felismerésének vizsgálata képezte. Erre modellrendszerként a SinI és a Sau96I metiltranszferázokat (MTáz) választottuk. Ezek felismerőhelye GGWCC ill. GGNCC, és az aláhúzott C-t alakítják 5-metil-citozinná. A munka közvetlen előzménye volt, hogy a SinI MTáznak sikerült relaxált specifitást mutató mutánsait izolálnunk. Ezek a mutáns enzimek a GGWCC szekvencia mellett a GGSCC szekvenciát is jó hatásfokkal metilálják, tehát specifitásuk GGNCC-re változott (l. alább) Ugyanebben a munkában kimutattuk, hogy a GGWCC és a GGSCC targetszekvenciák közötti megkülönböztetés a DNS kis árkában történik (Kiss és mtsai, 2001).

### M.SinI-M.Sau96I hibrid metiltranszferázok

A C5-MTázok egy nagy és egy kis doménből állnak. Sokáig a kis domént tekintették a szekvensspecifitás egyedüli meghatározójának. A kisárki kölcsönhatások fontosságának felismerése (Kiss et al., 2001), a két ismert kristályszerkezet (a HhaI és a HaeIII MTáz DNS-sel alkotott komplexe; Klimasauskas et al., 1994 és Reinisch et al., 1995), azt sugallta, hogy legalábbis a W és S megkülönböztetésben a kis árokkal kölcsönható nagy doménnek is szerepe van. Ezt bizonyítandó, olyan rekombináns (hibrid) MTázokat kíséreltünk meg előállítani, melyek részben a SinI, részben a Sau96I MTázból állnak. Olyan plazmidokat készítettünk, melyek a két gén deléciós változatát tandem elhelyezkedésben hordozzák. Ezekben a plazmidokban az első génnek a 3', a második génnek az 5' vége hiányzik. Mivel mindkét gén inaktív, a plazmidban lévő SinI helyek nem metiláltak. A két csonka MTáz gén között restrikciós emésztéssel kinyitott plazmidban exonukleáz emésztéssel random deléciósorozatot hoztunk létre, majd a plazmidokat ligáz enzimmel visszazártuk és *E. coli* sejtekbe juttattuk. A deléciók méretét úgy próbáltuk beállítani, hogy a fúzió helye a nagy és a kis domént kódoló génszakasz közé essen. Az így előállított rekombináns génkönyvtárból *in vitro* szelekcióval próbáltunk MTáz aktivitást mutató klónokat izolálni. Ennek alapelve az volt, hogy ha egy deléció és fúzió eredményeképpen aktív enzimet kódoló gén jön létre, a hordozó plazmid rezisztens lesz a SinI endonukleázzal szemben és így a vegyes plazmidpreparátumból SinI emésztés után egyszerű transzformációval *E. coli*-ban visszanyerhető. Sajnos sem a

SinI-Sau96I sem a Sau96I-SinI fúziók közül nem sikerült MTáz aktivitást mutató klónt nyerni. Ezt valószínűleg az magyarázza, hogy a szekvenciahasonlóság dacára a két enzim térszerkezete között túl nagy a különbség ahhoz, hogy aktív hibrid jöjjön létre.

#### Megváltozott specifitású M.SinI mutánsok vizsgálata

A munkának ezt a részét Venetianer Pál csoportjával kollaborációban végeztük. A korábban random mutagenézissel izolált, a szekvenciaspecifitás megváltozását (GGWCC helyett GGNCC) okozó N172S és V173L mutációkat kombinálva egy kettős-mutánst hoztunk létre. Megállapítottuk, hogy a két aminosavcsere fenotípusa additív. Az időközben Tímár és Venetianer által izolált L214S+Y229H kettős-mutánst is bevontuk ezekbe a vizsgálatokba. Összefoglalóan a következőket állapíthatjuk meg:

- 1) Valamennyi relaxált fenotípust okozó mutáció az enzim feltételezett nagy doménjében található, tehát nem a kis doménben, amelyet eddig a szekvenciaspecifitás egyedüli meghatározójának tartottak.
- 2) A mutánsok által mutatott specifitásváltozásnak enzimkinetikai szempontból nézve hasonló oka van: megnő a GGSCC szubsztráttal szembeni  $k_{cat}$  érték (Tímár et al., 2004 és közletlen eredményeink).
- 3) A mutáns enzimek tisztítása során - az aktivitást szubsztrátfelesleg mellett mérve - látszólag megváltozik a specifitás. Míg a nyers kivonatban a GGWCC helyet tartalmazó oligonukleotidba kb. ugyanannyi aktivitás épült be, mint a GGSCC helyet tartalmazóba, tisztított enzimmel mérve a GGSCC lesz a preferált szubsztrát. Eddigi vizsgálataink arra utalnak, hogy ennek oka az, hogy - szemben a vad típusú enzimmel - a mutánsok igen nagy affinitással rendelkeznek a metilált GGWCC helyek iránt, és ezért, amíg a tisztítás során jelen van a sejtből származó, metilált SinI helyeket tartalmazó DNS, az kompetitív inhibitorként viselkedik. Ehhez a magyarázathoz fel kell tételeznünk (és ezt az eddigi eredmények alátámasztják), hogy a mutáns enzimek affinitása a különböző helyekhez a következő: GGWCC > metilált GGWCC > GGSCC.

A mutáns MTázok jellemzésének lezárásaként meg akarjuk vizsgálni, hogy enzimatiszikus effektivitásuk milyen a Sau96I MTázzal összehasonlítva a sejtben, azaz milyen Sau96I endonukleázszinttel szemben képesek a GGWCC és GGSCC helyeket megvédeni *in vivo*.

### Enzimtisztítás röntgenkristallográfiai vizsgálatokhoz

Kollaborációt kezdtünk a DNS MTázok szerkezetvizsgálatában legnagyobb tapasztalattal rendelkező kristallográfussal (Xiaodong Cheng, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, U.S.A.). Több 10 mg homogén M.SinI preparátumot küldtünk. Sajnos, a kristályosítási kísérletek nem vezettek eredményre. Ez nem teljesen meglepő, ugyanis a sok próbálkozás ellenére mindmáig csak két bakteriális C5-MTáz DNS-sel alkotott komplexének szerkezetét sikerült meghatározni (Klimasauskas et al. 1994; Reinisch et al., 1995).

Ez és egy korábbi kudarc (eredménytelenek voltak a BspRI MTázzal és egy másik kristallográfussal folytatott próbálkozásaink is) az egész MTáz projekt átgondolására kényszerített bennünket. Nyilvánvalóvá vált, hogy bár a specifitásmutások vizsgálata hozhat értékes részeredményeket, a szekvenciaspecifitást szerkezet nélkül nem érthetjük meg, sőt olykor még a racionális kísérlettervezés sem lehetséges. Ezért az OTKA támogatás későbbi szakaszában elsősorban más, az OTKA munkatervben nem szereplő, azonban a témával összefüggő (restrikciós-modifikációs rendszerek, DNS-metiláció) kutatásokat kezdtünk.

## **Restrikciós endonukleázok**

### Egy különös viselkedésű EcoRI-RsrI hibrid restrikciós endonukleáz

Az EcoRI és az RsrI restrikciós endonukleázok (REáz) ugyanazt a szekvenciát ismerik fel (GAATTC) és aminosavszekvenciájuk kb. 50% hasonlóságot mutat (Stephenson et al., 1989). Ugyanakkor vannak olyan eredmények, amelyek arra utalnak, hogy a két enzim különböző mechanizmussal ismeri fel a DNS szubsztrátot (Aiken et al., 1991). Ennek az ellentmondásnak a vizsgálatára egy hőérzékeny EcoRI mutáns génje és az RsrI gén megfelelő darabjainak kicserélésével EcoRI-RsrI rekombináns géneket hoztunk létre. Az 5 vizsgált hibrid endonukleáz között egy olyat találtunk, amely aktivitást mutatott: az enzimet kódoló plazmid csak akkor volt fenntartható a sejtben, ha a sejt az endonukleáz ellen védelmet nyújtó EcoRI MTázt termelt. Ebben, az EERE-nek nevezett rekombináns fehérjében a 147-es és 206-os hely közötti, 60 aminosavból álló darab van RsrI-eredetűre cserélve. Mivel a szülői EcoRI enzimhez hasonlóan a hibrid fehérje is hőérzékenynek bizonyult, *in vivo* hatását EcoRI MTázt nem termelő (m-) sejtekben is vizsgálni tudtuk.

Megállapítottuk, hogy az enzimaktivitás szempontjából permisszív hőmérsékleten (30°C) a hibrid fehérje m- sejtekben legalább olyan toxikus, mint a kiinduláshoz használt EcoRI endonukleáz. A várakozással ellentétben azonban az EERE-t termelő sejtek nem mutattak fágrestrikciót és a sejtek kivonatában nem tudtunk specifikus endonukleáz aktivitást kimutatni. E meglepő, ellentmondásos fenotípus értékelésénél fontos hangsúlyozni, hogy nem valami aspecifikus toxikus effektusról, hanem egy egyelőre kiderítetlen mechanizmusú szekvensspecifikus DNS-fehérje kölcsönhatásról van szó. Ezt bizonyítja, hogy m+ (EcoRI MTázt termelő) sejtekben, tehát amikor a specifikus metiláció megvédi a GAATTC helyeket, az EERE hibrid nem toxikus. Kimutattuk, hogy részlegesen permisszív hőmérsékleten (37°C-on), ahol az EERE hatás még nem letális, indukálódik az SOS rendszer, ami DNS károsodásra utal. A kezdeti eredmények azt sugallták, hogy az EERE nem rendelkezik EcoRI aktivitással, és toxicitását csak az EcoRI helyekhez való túl erős kötődés okozza. Annak vizsgálatára, hogy az *in vivo* hatásban szerepe van-e a DNS hasításnak, létrehoztuk az EERE(E111G) mutánst. Az EcoRI endonukleázban a Glu111 az aktív hely része, és az EcoRI Glu111Gly mutációja több nagyságrenddel kisebb aktivitású, de a specifikus DNS-kötésre képes enzimet eredményez. Az E111G mutáció az EERE toxicitás megszűnéséhez vezetett, ami azt jelzi, hogy az EERE toxicitásának lényeges eleme az EcoRI endonukleáz aktivitás. EcoRI vágásokra és nem más jellegű kettősszalú DNS-törésekre utal az a megfigyelés is, hogy m- *recA* és *recB* törzsek nem voltak érzékenyebbek az EERE hatásra, mint az izogénikus vad típusú *E. coli* gazda (v.ö. Heitman et al., 1989; Heitman et al., 1999).

E hatás biokémiai mechanizmusának tisztázását mindmáig akadályozta, hogy a túltermelő *E. coli* sejtekben az EERE nagyrészt zárványtestekben, oldhatatlan formában halmozódik fel, és az oldható frakcióból nem sikerült tisztítani. Sikerült viszont a zárványtestekből guanidiumkloridban feloldott EERE-t legalább részben renaturálni és tisztítani. Kimutattuk, hogy a tisztított EERE gyenge (~1%) EcoRI endonukleáz aktivitással rendelkezik. Az emésztés optimális körülményei (puffer, hőmérséklet) az RsrI-éhez voltak hasonlóak. Kimutattuk, hogy az EERE kiméra erősebben kötődik EcoRI helyekhez, mint az EcoRI. Tudomásunk szerint ez az első példa egy aktivitással rendelkező hibrid II. típusú REáz-ra.

Annak vizsgálatára, hogy a 60 aminosavból álló szegmentum hogyan változtatta meg az EcoRI térszerkezetét, együttműködést kezdtünk Fuxreiter Mónikával (MTA SZBK Enzimológiai Intézet), aki az EcoRI-DNS komplex kristályszerkezetének (Grigorescu et al., 2004) felhasználásával molekuláris dinamikai szimulációs számításokat végzett. Megállapította, hogy az EERE kiméra szerkezete nagyon hasonlít az EcoRI-éhez, ugyanakkor több H-kötés révén kapcsolódik a targetszekvenciához, mint az EcoRI. Ez összhangban van a biokémiai eredményekkel. A számításokból adódó másik következtetés az volt, hogy az a két alegység között lévő kölcsönhatás, amely az EcoRI-ben a felismerés és a hasítás összekapcsolása szempontjából fontosnak látszik („crosstalk ring”, Kurpiewski et al., 2004) sérül a kimérában. Ez összhangban van az alacsony aktivitással.

Mivel a gyenge EcoRI aktivitás nem magyarázza meg az erős *in vivo* hatást, feltételeznünk kell egyéb tényezők hozzájárulását is. Így szóba jöhet az EcoRI helyekhez való erős kötődés (gátolhatja a replikációt és transzkripciót), vagy az is, hogy a reakció után az enzimmolekula csak lassan távozik a fragmentum végéről, ezzel gátolva a ligáz enzim kötődését, a DNS károsodás javítását. Ennek tisztázása további munkát igényel. A munka eddigi eredményeit leíró kézirat (Chuluunbaatar et al., A cleavage impaired EcoRI-RsrI chimeric endonuclease is highly toxic to *E. coli*: structural and physiological implications) készülöben van.

#### A BspRI és a BepI endonukleáz

Míg a hosszabb (elsősorban 6 bp) felismerőhelyű II. típusú restrikciós enzimekről igen sok ismeret halmozódott fel, kevesebbet tudunk a rövidebb szekvenciát felismerő enzimek működési mechanizmusáról, DNS-sel való kölcsönhatásáról. Ennek oka nagyrészt technikai: a DNS hasítás követésére a legegyszerűbb módszer egy supercoiled plazmid relaxációjának ill. linearizációjának követése, és a rövid felismerőhelyű enzimekhez sok esetben nehéz olyan plazmidot találni, amelyben csak egyetlen felismerőhely van.

Két olyan, 4-es felismerőhelyű restrikciós-modifikációs rendszer (BspRI, GGCC és BepI, CGCG) endonukleázának a génjét sikerült klónozni, melyekhez tartozó MTÁzt már korábban klónoztuk (Szomolányi et al., 1980; Kupper et al., 1989). Valójában

mindkét esetben a MTáz gén mellett az endonukleáz génjét is klónoztuk korábban, azonban ez sokáig nem volt nyilvánvaló, mert a gén nem fejeződött ki *E. coli*-ban.

A BspRI gén klónozásához tisztítottuk az enzimet és hagyományos Edman módszerrel, valamint tömegspektrometriával részleges aminosavszekvenciát határoztunk meg. A szekvenciameghatározás D. Marshak laboratóriumában (Cold Spring Harbor Laboratory) ill. az SZBK Proteomikai Csoportjában történt. Ezt felhasználva sikerült először a gén egy darabját PCR-rel amplifikálni. Ekkor jöttünk rá, hogy a BspRI REáz gén rajta van azon a fragmentumon, melyen a BspRI MTáz-t klónoztuk. Meghatároztuk a gén nukleotidszekvenciáját. A kódolt fehérje 317 aminosavból áll (36 kDa). Kiderült, hogy a gén TTG startkodonnal rendelkezik, ezért nem fejeződik ki *E. coli*-ban. A BspRI gént - startkodonját ATG-re módosítva és jobb Shine-Dalgarno szekvenciával ellátva - pBAD24 expressziós vektorba ültettük. Így már jelentős aktivitást kaptunk *E. coli*-ban. Ebből a törzsből nagyobb mennyiségű homogén enzimet preparáltunk. Sikerült egy olyan plazmidot találnunk, melyben csak egyetlen GGCC hely van (pC194, *B. subtilis* plazmid), ezzel megkezdtük a BspRI enzimológiai vizsgálatát. A BspRI volt az első IIP típusú REáz, amelyről kimutatták, hogy valószínűleg monomerként működik (Koncz et al. 1978). Ezt az eredményünket sokáig szkepszissel fogadták, mivel nem illett bele abba a sok 6-os felismerőhelyű enzim példájával támogatott logikus képbe, mely szerint a palindrom felismerőhely mindkét szálának hasításához homodimer REáz (két aktív hely) kell. Ezt a képet megváltoztatta az utóbbi időben két 4-es felismerőhelyű REáz specifikus DNS komplexéről kapott kristályszerkezet: az MspI (CCGG) és a HinPII (GCGC) monomerként kapcsolódik a szubsztrátszekvenciához (Xu et al., 2004; Yang et al., 2005; Xu et al., 2005). Ez egyrészt azt jelzi, hogy a rövidebb felismerőhelyű enzimek között vannak egyetlen alegységből állók, sőt még az is lehet, hogy ez a tipikus, másrészt felveti a kérdést, hogyan történik a kettősszalú célszekvencia felismerése és mindkét DNS szál hasítása ha az enzim egyetlen aktív hellyel rendelkezik? Erre szeretnénk választ kapni a BspRI és esetleg a BepI (l. lentebb) vizsgálatával. A MTáz projekt kudarca után biztató, hogy jelenleg 20 körül van azoknak a II. típusú REázoknak a száma, melyekről van kristályszerkezet. Ez azt sugallja, hogy a REázok könnyebben kristályosíthatók, mint a MTázok.

A BepI MTáz gént hordozó plazmidon (pBep-A), a MTáz gén mellett találtunk egy ismeretlen funkciójú, 348 aminosavból álló fehérjét meghatározó ORF-et. A MTáz génhez való közelség azt sugallta, hogy ez lehet a BepI REáz génje. Ez a feltevés igazolódott, mert a gént PCR amplifikáció után pT7-7 expressziós vektorplazmidba ültetve a sejtkivonatban jelentős BepI endonukleáz aktivitást tudtunk kimutatni. Ez azt bizonyítja, hogy az eredeti klónban azért nem tudtunk BepI aktivitást kimutatni, mert a gén promotere *E. coli*-ban nem működik. A BepI munka eredményeit leíró kézirat (Slaska-Kiss, K. and Kiss, A. „Characterization of a *Brevibacterium epidermidis* plasmid carrying the BepI restriction-modification system and genes suggesting the ability of horizontal transfer” készülóban van.

## **A restriktív-modifikációs rendszerek nómenklatúrája**

Társszerzője vagyok az alábbi közleménynek:

Roberts, R.J., Belfort, M., Bestor, T., Bhagwat, A.S., Bickle, T.A., Bitinaite, J., Blumenthal, R.M., Degtyarev, S.K., Dryden, D.T.F., Dybvig, K., Firman, K., Gromova, E.S., Gumpert, R.I., Halford, S.E., Hattman, S., Heitman, J., Hornby, D.P., Janulaitis, A., Jeltsch, A., Josephsen, J., Kiss, A., Klaenhammer, T.R., Kobayashi, I., Kong, H., Krüger, D.H., Lacks, S., Marinus, M.G., Miyahara, M., Morgan, R.D., Murray, N.E., Nagaraja, V., Piekawicz, A., Pingoud, A., Raleigh, E., Rao, D.N., Reich, N., Repin, V.E., Selker, E.U., Shaw, P.-C., Stein, D.C., Stoddard, B.L., Szybalski, W., Trautner, T.A., Van Etten, J.L., Vitor, J.M.B., Wilson, G.G. and Xu, S. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* **31**: 1805-1812.

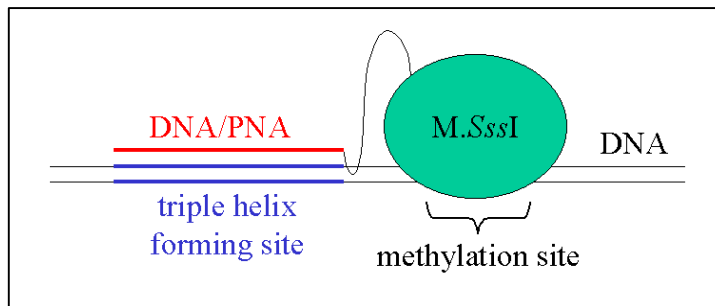
## **Lépések egy irányítható specifikus DNS-metiltransferáz előállítására felé**

A magasabbrendű eukarioták, így az ember DNS-ében is a citozin bázisok egy része metilált (5-metil-citozin). Ezek szinte kizárólag CG dinukleotidban fordulnak elő. A DNS-metiláció fontos szerepet játszik olyan biológiai folyamatokban, mint az egyedfejlődés, X kromoszóma inaktiválódás, a genomba épült retrovírusok génjeinek

inaktiválása, karcinogenezis (pl. Leonhardt and Cardoso, 2000). A jelenlegi ismeretek szerint egy gén promoterében lévő CG-k metilálása általában a gén transzkripciójának gátlásához vezet. Elméleti és gyakorlati szempontból egyaránt fontos lenne, ha egy-egy promoter működését szelektíven tudnánk befolyásolni.

Nemzetközi kooperációban megpróbálunk olyan DNS MTÁzt előállítani, melynek metilációs szelektivitását a hozzá kovalensen kötött oligonukleotid, vagy peptid nukleinsav (PNA) oligomer révén befolyásolni lehet. A választásunk az SssI MTázra esett, ugyanis ennek specifitása (CG) megegyezik az eukariota MTázok specifitásával (Renbaum et al., 1990).

Az N-, vagy C-terminálisan kapcsolt oligonukleotid/PNA szerepe az lenne, hogy szekvensspecifikus triplexet képezve (Casey and Glazer, 2001) a MTÁzt a kívánt helyre „lehorgonyozza”. A helyhez kötött M.SssI így elsősorban a közelében lévő CG helye(ke)t tudná metilálni (1. ábra).



**1. ábra.** M.SssI irányítása egy meghatározott CG szekvenciához kovalensen kötött oligonukleotid/PNA segítségével.

Az előre látható, hogy a konjugátum metilációs szelektivitása több tényezőtől függ majd, így a triplex specifitásától, stabilitásától, valamint attól, mennyire lehet a MTáz „szabad” aktivitását visszaszorítani. Ez utóbbira valószínűleg a szubsztrátkötés erősségét gyengítő mutációk lennének legalkalmasabbak. A vázolt megközelítésnek az elvi megvalósíthatóságát egy restriktív enzimmel már demonstrálták (Eisenschmidt et al., 2005).

A nemzetközi kooperációban, melyet az EU támogatott (QLK3-CT2001-00448), ill. támogat (CRAFT 017984), csoportunk feladata olyan M.SssI variánsok előállítása, melyek alkalmasak oligonukleotidhoz történő kapcsolásra. Az oligonukleotidhoz történő



kapcsolást két német csoportban végezték/végzik (A. Jeltsch, Bremen; E. Weinhold, Aachen) Az enzim és az oligo/PNA rész közötti kapcsolat kémiaja olyan M.SssI mutánsokat igényel, melyekben N-vagy C-terminálisan cisztein van. Egy további kíváncsúság volt, hogy az enzim egyik belső ciszteinjét (Cys368) más aminosavra cseréljük. A másik ciszteint (Cys141) meg kellett őrizni, mert ez kulcsszerepet játszik a katalízisben. Fontos volt az is, hogy az enzim könnyen, nagy mennyiségben tisztítható legyen.

E munka során sokáig nagy nehézséget okozott, hogy a tervezett plazmidok egy részét nem tudtuk létrehozni, feltehetően azért, mert a gazda-DNS kiterjedt metiláltsága (vagy az enzim DNS-hez való kötődése) miatt a klón nem volt életképes. Akkor sikerült stabil klónokat kapnunk, ha a nagyon jól represszálható promotert használó pBAD24 vektort alkalmaztuk. Az enzimtermelés L-arabinóz adásával indukálható.

A munka során nagyon sok variánst kellett létrehoznunk, alapvetően azért, mert több, elvben jónak látszó stratégia csődöt mondott. Az előállított M.SssI variánsok többsége két alaptípusba sorolható:

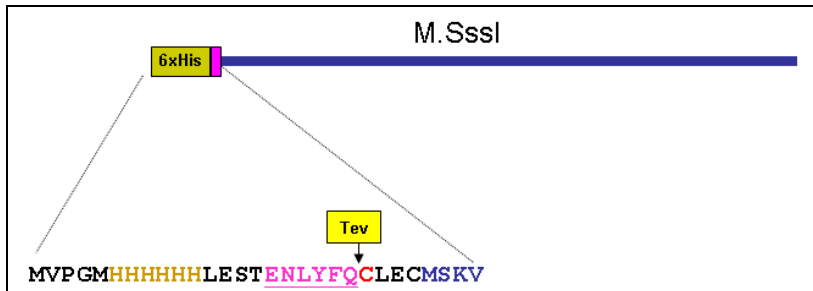
#### 1. *Ser2Cys mutáns, C-terminális 6xHis nyúlvány.*

Bár a lánckezdő fMet lehasad, és így cisztein lesz az N-terminális aminosav, ez a variáns nem bizonyult használhatónak, mert a lánckezdő cisztein – valószínűleg a sejtől hozott modifikáció miatt - nem reagált a kapcsolási (kémiai keresztkötés) reakcióban. Ezt a bajt még tetézte, hogy a katalitikus Cys141 viszont nagyon erősen reagált a keresztkötő reagenssel. A katalitikus cisztein reaktivitása azt jelentette, hogy a C-terminális ciszteint hordozó variáns sem használható, azaz a bifunkciós reagenssel történő kémiai keresztkötés nem alkalmazható.

#### 2. *Fúziós konstrukciók.*

A terminális kapcsolat egy alternatív módszere az ún. natív kémiai peptidligálás. E módszerhez N-terminális ciszteinre van szükség, és előnye, hogy a belső ciszteinek nem reagálnak. Fúziós fehérjéket hoztunk létre, melyek N-terminális része egy affinitáskromatográfiás tisztítást lehetővé tevő hosszabb-rövidebb peptid (FLAG, 6xHis) vagy fehérje (maltose binding protein), a C-terminális felé eső rész pedig az SssI MTáz. A két részt egy specifikus proteáz (enterokináz, Xa-faktor, Tev) felismerőhelye választja el. A fúziót úgy alakítottuk ki, hogy a proteáz hasítás eredményeképpen a MTáz

lánckezdő aminosava cisztein legyen. Sajnos az enterokináz és a Xa faktor nem bizonyult elég specifikusnak, nem sikerült olyan körülményeket találni, amikor csak a kívánt hasítás következik be és a MTáz nem sérül. Jobb eredményeket kaptunk a Tev proteázzal. A Tev proteáz hasítóhelyet tartalmazó variáns (2. ábra) specifikusan hasítható, az oligonukleotidhoz való kapcsoláson most dolgoznak az aacheni laboratóriumban.



**2. ábra.** A pBNHT-MSsSI plazmid által kódolt SssI MTáz N-terminális szekvenciája. Az aláhúzás a Tev proteáz felismerőhelyét jelöli.

Az irányított MTáz tervezett felhasználása több, még kidolgozás, vagy fejlesztés alatt álló metodika együttes alkalmazását követeli meg. Ezek közül az egyik az oligonukleotidhoz kapcsolt MTáz bejuttatása a sejtmagba. Az erre alkalmas módszer kidolgozása elsősorban a konzorciumban résztvevő holland kollégák érdeme. Készülő kéziratunk: van der Gun, B.T., Monami, A., Geel, T.M., Laarmann, S., Raskó, T., Ślaska-Kiss, K., Weinhold, E., Wasserkort, R., de Leij, L.F., Marcel H. Ruiters, Kiss, A., McLaughlin, P.M., “Use of the cationic amphiphilic lipid Saint-2 to mediate intranuclear protein delivery”.

Ugyancsak a groningeni csoporttal való együttműködés keretében készítettünk két olyan plazmidot, mely az M.SssI génjét az emlős sejtben működő citomegalovírus promoterhez kapcsolva hordozza. A cél annak a vizsgálata, hogy az idegen CG-specifikus MTáz miként befolyásolja egyes tumorsejtek jellegzetes fehérjéinek termelődését.

Az SssI metiltranszferáz topozomeráz aktivitásának vizsgálata

Az SssI metiltranszferáz  $Mg^{2+}$  jelenlétében gyenge topoizomeráz I aktivitást mutat. A MTáz és több topoizomeráz között észlelt gyenge szekvenciahasonlóság alapján feltételezték, hogy az SssI MTáz 137-es tirozinja játsza azt a szerepet, amelyet az I. típusú topoizomerázok aktív helyében lévő tirozin (Matsuo et al., 1994). Ennek a hipotézisnek a vizsgálatára helyspecifikus mutagenézissel létrehoztuk a Tyr137Phe cserét. A mutáns enzim megőrizte a MTáz aktivitást, de nem mutatott topoizomeráz aktivitást, ez összhangban van a Matsuo és munkatársai által közölt hipotézissel.

### Irodalmi hivatkozások

- Aiken, C.R., McLaughlin, L.W., and Gumport R.I. (1991). The highly homologous isoshizomers RsrI endonuclease and EcoRI endonuclease do not recognise their target sequence identically. *J. Biol. Chem.* **266**: 19070 - 19078.
- Casey, B.P. and Glazer, P.M. (2001) Gene targeting via triple-helix formation. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **67**: 163-192.
- Eisenschmidt, K., Lanio, T., Simoncsits, A., Jeltsch, A., Pingoud, V., Wende, W. and Pingoud, A. (2005) Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific cleavage. *Nucleic Acids Res.* **33**: 7039-7047.
- Grigorescu, A., Horvath, M., Wilkosz, P.A., Chandrasekhar, K. and Rosenberg, J.M. (2004) The integration of recognition and cleavage: X-ray structures of pre-transition state complex, post-reactive complex, and the DNA-free endonuclease. In *Restriction Endonucleases, Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol. 14, Pingoud, A. (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.137-177.
- Heitman, J., Zinder, N.D., Model, P. (1989). Repair of the *Escherichia coli* chromosome after *in vivo* scission by the EcoRI endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2281 - 2285.
- 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.
- Kiss, A., Pósfai, G., Zsurka, G., Raskó, T. and Venetianer, P. (2001) Role of DNA minor groove interactions in substrate recognition by the M·SinI and M·EcoRII DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* **29**: 3188-3194.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R.J. and Cheng, X. (1994) HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell* **76**: 357-369.
- Koncz, C., Kiss, A. and Venetianer, P. (1978) Biochemical characterization of the restriction-modification system of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Biochem.* **89**: 523-529.
- Kupper, D., Zhou, J.-G., Venetianer, P. and Kiss, A. (1989) Cloning and structure of the BepI modification methylase. *Nucleic Acids Res.* **17**: 1077-1088.
- Kurpiewski, M.R., Engler, L.E., Wozniak, L.A., Kobylanska, A., Koziolkiewicz, M., Stec, W.J. and Jen-Jacobson, L. (2004) Mechanism of coupling between DNA recognition specificity and catalysis in EcoRI endonuclease. *Structure* **12**: 1775-1788.
- Leonhardt, H., and Cardoso, M.C. (2000) DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem.* **35**:78-83.
- Matsuo, K., Silke, J., Gramatikoff, K. and Schaffner, W. (1994) The CpG-specific methylase SssI has topoisomerase activity in the presence of  $Mg^{2+}$ . *Nucleic Acids Res.* **22**: 5354-5359.
- Reinisch, K.M., Chen, L., Verdine, G.L. and Lipscomb, W.N. (1995) The crystal structure of HaeIII methyltransferase covalently complexed to DNA: an extrahelical cytosine and rearranged base pairing. *Cell* **82**: 143-153.
- Renbaum, P., Abrahamove, D., Fainsod, A., Wilson, G.G., Rottem, S. and Razin, A. (1990) Cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for the CpG DNA methylase from *Spiroplasma* sp. strain MQ1(M.SssI). *Nucleic Acids Res.* **18**:1145-1152.

- Stephenson, F.K., Ballard, B.T., Boyer, H.W., Rosenberg, J.M., and Greene, P.J. (1989). Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the RsrI and EcoRI restriction endonucleases. *Gene* **85**: 1 - 13.
- Szomolányi, É., Kiss, A. and Venetianer, P. (1980) Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus* R in *Escherichia coli*. *Gene*, **10**: 219-225.
- Tímár, E., Groma, G., Kiss, A. and Venetianer, P. (2004) Changing the recognition specificity of a DNA-methyltransferase by *in vitro* evolution. *Nucleic Acids Res.* **32**: 3898-3903.
- Xu, Q.S., Kucera, R.B., Roberts, R.J. and Guo, H-C. (2004) An asymmetric complex of restriction endonuclease MspI on its palindromic DNA recognition site. *Structure* **12**: 1741-1747.
- Xu, Q.S., Roberts, R.J. and Guo, H-C. (2005) Two crystal forms of the restriction enzyme MspI-DNA complex show the same novel structure. *Protein Sci.* **14**: 2590-2600
- Yang, Z., Horton, J.R., Maunus, R., Wilson, G.G., Roberts, R.J. and Cheng, X. (2005) Structure of HinPII endonuclease reveals a striking similarity to the monomeric restriction enzyme MspI. *Nucleic Acids Res.* **33**: 1892-1901.