

Emlősökben az epigenetikus szabályozásnak a legrégebben felfedezett, legjobban ismert eleme a DNS metiláció. A citozinok egy része metilált (C5-metilcitozin), ezek a metilált citozinok nagyrészt 5'-CG-3' dinukleotidokban („CpG helyek”) találhatóak. A promoterrégiók CpG helyeinek metilálása általában a gén kikapcsolásához vezet. A DNS metiláció szerepének és a genomban kódolt információnak a mélyebb megértését segítené, ha a genom egyes régióit, vagy akár egyetlen CpG-t szelektíven tudnánk metilálni. Erre az irányított vagy célzott DNS-metilációra az első próbálkozás 1997-ben történt, amikor az SssI DNS-metiltranszferázt (MTáz) egy szekvenciaspecifikus DNS-kötő cink-ujj fehérjéhez (zinc finger, ZF) fúzionálták azzal a céllal, hogy a MTáz a ZF domén révén a DNS egy kiválasztott helyéhez kössék. Az elképzelés az volt, hogy az enzim elsősorban a közeli CpG helyeket fogja metilálni. *In vitro* rendszerben sikerült is a ZF kötőhely környékén preferenciális metilációt kimutatni (Xu and Bestor, 1997). Azóta több olyan közlemény jelent meg, amelyek arról tudósítottak, hogy emlős sejtekben vagy *E. coliban* sikerült irányított DNS metilációt elérni. Ezek azonban egytől-egyig „proof-of-principle” cikkek maradtak, a módszer nem vált a molekuláris biológiai eszköztár részévé.

Ennek fő okai a következők:

- 1) A szükségesnél kisebb a specifitás, azaz túl nagy gyakorisággal metilálódnak nem célzott helyek.
- 2) A közölt módszerek túl bonyolultak, alkalmazásuk nehézkes.

Az OTKA támogatással végrehajtott kutatásunk általános célja az volt, hogy megpróbáljunk az irányított metiláció módszerén javítani, elsősorban a specifitását növelni. Munkánkhoz a bakteriális SssI DNS MTáz (M.SssI) használtuk, amelynek specifitása CG, tehát megegyezik az emlős DNS MTázokéval. Kísérleteinket *E. coliban* végeztük. Irányítódoméknként két 6 egységből (ujjból) álló és 18 bp-os DNS szakaszokat felismerő cink-ujj fehérjét (6ZA és 6ZB) használtunk (Gommans et al., 2007; l. alább).

A munkatervnek megfelelően két irányba indítottuk a kutatást:

- 1) Meg akartuk vizsgálni, hogy a fragmentumkomplementáció jelenségét az SssI MTáz esetében ki lehet-e használni a specifitás növelésére. A fragmentumkomplementáción alapuló stratégia, melyet korábban egy másik C5-MTázra alkalmazva javasoltak (Nomura and Barbas, 2007), ígéretes, de ellentmondásos (Meister et al, 2008) megközelítésnek látszott. Mivel ezt eredetileg olyan MTázokkal demonstrálták, amelyek specifitása alkalmatlan eukarióta

sejtekben történő általános felhasználásra, ki akartuk deríteni, működik-e a CG-specifikus M.SssI-gyel.

2) Megvizsgáltuk, hogy lehet-e az irányított metiláció specifikusát olyan enzimvariánsok felhasználásával növelni, amelyek gyengébben kötődnek a DNS-hez, mint a vad típusú MTáz.

Fragmentumkomplementáció

Korábban kimutattuk, hogy az M.SssI [1-304]-es és [191-386]-os fragmentumai, melyek egyenként inaktívak, képesek gyenge aktivitású enzimé összeállni, ha ugyanabban az *E. coli* sejtben szintetizálódnak. Első célunk az volt, hogy ennek a jelenségnek a határait felderítsük, megvizsgáljuk a komplementációs képesség feltételeit. Ennek érdekében olyan plazmid sorozatot állítottunk elő, amelynek tagjai az M.SssI különböző hosszúságú N- vagy C-terminális fragmentumait kódolták és meghatároztuk, hogy az egyes fragmentumkombinációk milyen komplementációs képességgel rendelkeznek. Megállapítottuk, hogy a C-terminális fragmentumok közül azok komplementálnak a legjobban, amelyek az M.SssI feltételezett nagy és kis doménje között kezdődnek. Az N-terminális fragmentumok esetében nem lehetett ilyen egyértelmű törvényszerűséget felfedezni. A MTáz aktivitást mutató fragmentumpárok tagjai között általában volt hosszabb-rövidebb átfedés, de találtunk olyan komplementáló párt is, amelynek tagjai között nem volt átfedés. Bebizonyítottuk, hogy az *in vivo* észlelt MTáz aktivitás valóban az enzimfragmentumok közötti komplementáció miatt jön létre és nem annak az eredménye, hogy az átfedő génszakaszokból homológ rekombináció révén helyreáll az intakt M.SssI gén. Radioaktív S-adenozil-metionin metildonor felhasználásával megállapítottuk, hogy a legjobban komplementáló fragmentumpárok aktivitása a vad típusú enzimének csak ~2 %-a.

A gének összeépítésével fúziót hoztunk létre négy M.SssI fragmentum ([1-239], [1-304], [241-386], [261-386] valamint ZF domének között. A 6ZB domént az N-terminális fragmentumok elejéhez, míg a 6ZA domént a C-terminális fragmentumok végéhez építettük. Megállapítottuk, hogy a ZF doménekkal való fúziók nem csökkentik lényegesen a fragmentumok komplementációs képességét. A fenti eredményeket egy közleményben mutattuk be (Ślaska-Kiss et al, 2012).

A közlemény elfogadása után további fúziókat hoztunk létre N-terminális fragmentumok és a 6ZB domén, valamint C-terminális fragmentumok és a 6ZA ZF domén között (1. táblázat). A metilációs specifikitást egy olyan kísérleti rendszerben kezdtük vizsgálni, mint amilyenben a teljes hosszúságú mutáns enzimeket tanulmányoztuk (l. alább). Az eddig tesztelt kombinációkkal nem sikerült a kívánt specifikitási metilációt elérni.

6ZB-[M.SssI fragm.]	[M.SssI fragm.]-6ZA
pB6ZB-Sss[1-304]	pOB-Sss[241-386]-6ZA
pB6ZB-Sss[1-317]	pOB-Sss[250-386]-6ZA
pB6ZB-Sss[1-318]	pOB-Sss[261-386]-6ZA
pB6ZB-Sss[1-324]	
pB6ZB-Sss[1-304]	
pB6ZB-Sss[1-317]	
pB6ZB-Sss[1-318]	
pB6ZB-Sss[1-324]	

1. táblázat. M.SssI fragmentum-ZF domén fúziós fehérjéket kódoló plazmidok. A szögletes zárójelben lévő számok a fragmentum elejét és végét képező aminosavat jelölik (az SssI MTáz 386 aminosavból áll). 6ZA és 6ZB: 18 bp-os szekvenciát felismerő (1. ábra) ZF domének. Az N-terminális fragmentumokat expresszáló plazmidok (pB6ZB-) ampicillin, míg a C-terminális fragmentumokat expresszáló plazmidok (pOB-) kanamicin rezisztenciát kódolnak. Az előbbiek ColE1, míg az utóbbiak p15A replikonnal rendelkeznek, tehát kompatibilisak.

A munkatervben az szerepelt, hogy irányított evolúcióval olyan M.SssI fragmentumpárokat próbálunk szelektálni, amelyek egymáshoz való affinitása gyenge, és ahhoz, hogy aktív enzimmé álljanak össze, szükség van arra, hogy a ZF-ek segítségével egymás közelébe kötődjenek. Ehhez a munkához hozzákezdünk, de a felmerült technikai nehézségek miatt úgy éreztük, hogy a két projektet nem fogjuk tudni párhuzamosan vinni, ezért a továbbiakban a gyenge kötőképességű mutánson alapuló megközelítésre koncentráltunk (lásd alább). A döntésben az is szerepet játszott, hogy egy amerikai csoportnak sikerült egy olyan fragmentumpárt létrehozni, amellyel *E. coli*-ban nagy specifikitási célzott DNS metilációt tudtak elérni (Chaikind et al, 2012, Chaikind és Ostermeier, 2014).

A fragmentumkomplementáción alapuló stratégiával kapcsolatban hangsúlyozni kell, hogy a módszer továbbra sincs készen, többek között azért sem, mert nincs bizonyíték arra, hogy a fragmentumkomplementáció emlős sejtekben is működik. Figyelmeztető jel, hogy eddig csak akkor tudtunk enzimaktivitást detektálni, ha a két M.SssI fragmentum ugyanabban az *E. coli*

sejtben együtt termelődött, a sejt kivonatokat *in vitro* kombinálva nem volt kimutatható MTáz aktivitás. Annak kiderítésére, hogy az M.SssI fragmentumkomplementáció működik-e emlős sejtekben, közös munkát kezdtünk Marianne G. Rots csoportjával (University Medical Center Groningen, Hollandia).

Gyenge DNS-kötő képességű mutáns felhasználása

Ez a stratégia azon az elképzelésen alapszik, hogy ha a MTáz DNS-hez való affinitását csökkentjük, akkor csökken a valószínűsége annak, hogy a fúziós MTáz nem célzott CpG hely(ek)hez kötődik, míg a célzott CpG helynél ezt a gyenge affinitást az kompenzálja, hogy a MTáz a ZF domén révén kötődve hosszabb ideig tartózkodik ott. Korábbi munkánk során létrehoztunk két olyan M.SssI mutáns (Q147L és T313H), melyek DNS-hez mutatott affinitása csökkent (Darii et al, 2009). Kezdetben elsősorban ezzel a két mutánssal dolgoztunk, később bevontuk a munkába a nagyon kis aktivitású (Rathert et al, 2007), de a vad típusú enzimhez hasonló DNS-affinitású (Darii et al, 2009) C141S mutáns is.

A metiláció specifikitását *E. coli*-ban vizsgáltuk. Létrehoztunk egy plazmid sorozatot, amelynek tagjai a következő, a kísérleteink szempontjából kiemelendő elemeket hordozták:

1) A ZF-M.SssI (vagy M.SssI-ZF) fúzió génjét. Két ZF domént (6ZA és 6ZB) alkalmaztunk. Mivel nem tudtuk, melyik elrendezés lesz előnyösebb a metiláció specifikitása szempontjából, N- és C-terminális fúziókat is készítettünk, sőt készült egy, a MTáz mindkét végén ZF domént hordozó ún. szendvicsfúzió is (2. táblázat). A domének sorrendjének és a target régió szerkezetének kialakításakor a ZF fehérjék DNS-hez való kötődéséről ismertek szerint jártunk el (3'→5' felel meg a ZF N→C irányának). A fúziós gének a P_{BAD} promotor transzkripciót kontrollja alatt állnak, expressziójuk arabinózzal indukálható.

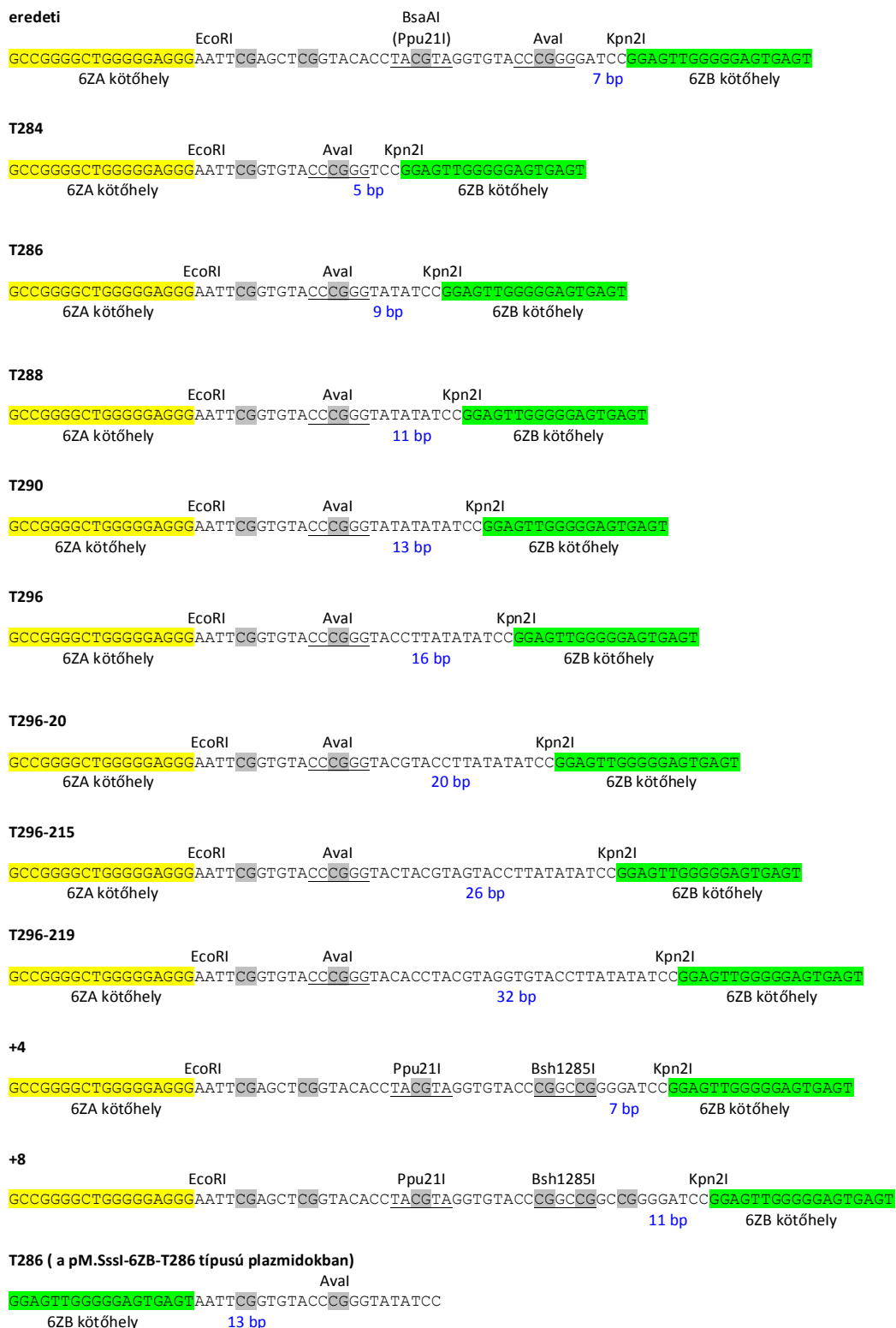
2) A target régió valamelyik változatát. A target régió egy legalább 2 CG-t tartalmazó rövid DNS szakaszból és az ezt két oldalról határoló két ZF kötőhelyből (6ZA és 6ZB) áll (1. ábra). Az eredeti elképzelés szerint a target régió és a ZF-M.SssI/M.SssI-ZF hibrid fehérjét kódoló gének nem ugyanazon a plazmidon lettek volna (ez a megoldás technikailag egyszerűbbé tette volna a munkát). Miután kiderült, hogy a két plazmidot tartalmazó preparátumok emésztésekor kapott restriktációs mintázat túl komplex ahhoz, hogy megbízhatóan értékeljük,

mindkét elemet ugyanarra a plazmidra ültettük és a továbbiakban ilyen egyplazmidos rendszerrel dolgoztunk.

A metiláció specificitását első közelítésben restriktációs emésztéssel kívántuk jellemezni. Ennek érdekében a targetrégiót úgy terveztük, hogy a célzott CG egy olyan restriktációs enzim felismerőhelyében legyen, amelyről ismert, hogy a CG-specifikus metiláció meggátolja a hasítást. Ennek megfelelően a targetrégióban egy BsaAI helyet (5'-YACGTR/5'-YACGTR) alakítottunk ki. A REBASE adatbázis (Roberts et al, 2015) szerint az M.SssI-specifikusan metilált BsaAI helyet (5'-YA^{m5}CGTR/5'-YA^{m5}CGTR) sem a BsaAI, sem annak Ppu21I nevű isoschizomerje nem képes hasítani. (Ezt kísérletesen mi is igazoltuk). Munkánkat sokáig hátráltatta, hogy sem BsaAI-gyel, sem Ppu21I-gyel nem tudtuk a targetrégióban lévő TACGTA hely védettségét kimutatni olyan plazmidok esetében sem, amelyekről utóbb kiderült, hogy a targetrégióban nagy gyakorisággal hordoznak metilált citozint. Szerencsére sikerült egy másik enzimet (AvaI) találni, amelynek az eredeti targetrégióban is volt egy felismerőhelye (CCCGGG, egyben SmaI hely, 1. ábra), és amellyel ki tudtuk mutatni egy, a targetrégió belüli CpG hely védettségét, azaz metilációját. A továbbiakban elsősorban AvaI-et használtunk a metilációs specificitás vizsgálatára.

Azt, hogy a BsaAI-gyel és Ppu21I-gyel kapcsolatos kudarcnak mi volt az oka, egyelőre nem tudjuk biztosan. Úgy gondoljuk, hogy a magyarázat abban rejlik, hogy a C5-MTázok a szimmetrikus felismerőhely két szálát egymástól független eseményben, a felismerőhelyhez ellenkező irányból kötődve metilálják és ezért a ZF kötőhelyhez horgonyzott enzim a hozzá közeli CG helyhez csak az egyik szál metilálásához megfelelő orientációban tud hozzáférni. Ha a tesztelésre használt restriktációs endonukleáz érzékeny a hemimetilációra (feltevésünk szerint ilyen az AvaI), akkor a közeli CpG hely hemimetilációját ki tudjuk mutatni, ha hasítja a hemimetilált helyet (valószínűleg ilyen a BsaAI és a Ppu21I), akkor nem. Ennek a hipotézisnek a bizonyítása folyamatban van.

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, a metiláció szempontjából mi a ZF kötőhely és a célzott CG optimális távolsága, egy olyan plazmid sorozatot készítettünk, amelynek tagjaiban a 6ZB cink-ujj kötőhely és az AvaI helyben lévő CG távolsága 5, 9, 11, 13, 16, 20, 26, ill. 32 bp. (Az eredeti plazmidban ez a távolság 7 bp volt.). A targetrégiók szekvenciáját az 1. ábra mutatja. Két változat (+4 és +8, 1. ábra) vizsgálatához AvaI helyett egy másik enzimet (Bsh1285I, felismerőszekvencia: CGGCCG) használtunk a specifikus metiláció kimutatására.



1. ábra. A különböző targetrégiók nukleotidszekvenciája. Az egyes targetrégiók nevei a szekvenciák fölött bal oldalt láthatók. Sárga ill. zöld kiemelés jelzi a két ZF kötőhelyet, szürke kiemelés pedig a két kötőhelyen belüli CG helyeket. A szekvenciák alá írt kék számok a legközelebbi olyan CG-nek a 6ZB kötőhelytől mért távolságát jelzik, melynek metilációs állapotát restriktációs enzimessal vizsgálható.

A nem specifikus „off-target” metiláció kimutatására Hin6I emésztést (GCGC, a G^{m5}CGC/G^{m5}CGC hely védett) használtunk.

A meghatározás úgy történt, hogy indukátlan és arabinózzal indukált tenyészetből izolált plazmidokat megemésztettük M.SssI-specifikus metilációra érzékeny enzimekkel, majd az emésztményeket agaróz-gélelektroforézissel vizsgáltuk. Az indukció hatására megjelenő új “védett” fragmentum(ok) méretéből következtettünk a metilált hely(ek)re, a metiláció specifikítására (2. ábra).

6ZB-M.SssI	M.SssI-6ZA	³ M.SssI-6ZB	6ZB-M.SssI-6ZA
pZB-M.SssI	pMSssI(C141S)-6ZA	pMSssI-6ZB-T286	pZB-MSssI-6ZA
pZB-M.SssI(Q147L)		pMSssI(T313H)-6ZB-T286	pZB-MSssI(C141S)-6ZA
pZB-M.SssI(T313H)		pMSssI(C141S)-6ZB-T286	
pZB-M.SssI(C141S)			
pZB-MSssI(T313H)-T284			
pZB-MSssI(T313H)-T286			
pZB-MSssI(T313H)-T288			
pZB-MSssI(T313H)-T290			
pZB-MSssI(T313H)-T296			
pZB-MSssI(T313H)-T296-20			
pZB-MSssI(T313H)-T296-215			
pZB-MSssI(T313H)-T296-219			
pZB-MSssI(T313H)+4			
pZB-MSssI(T313H)+8			
pZB-M.SssI(T313H)L1-T286			
pZB-M.SssI(T313H)L1-T288			
pZB-M.SssI(C141S)L1			
pZB-M.SssI(T313H)L11			
pZB-M.SssI(C141S)L11			
¹ pZdB-MSssI(T313H)L1			
² pYB-MSssI(T313H)			

2. táblázat. M.SssI variánsok és ZF domének közötti fúziókat kódoló plazmidok.

A targetrégiókra a plazmidok nevének toldalékai (+4, +8, T284, T286, stb.) utalnak, nukleotidszekvenciájukat lásd az 1. ábrán. Ha nincs a targetrégióra utaló toldalék (pl. pZB-MSssI), a plazmid az “eredeti” targetrégiót hordozza.

Az L1 ill. L11 toldalékok olyan származékokat jelölnek, amelyekben a ZF és a MTáz domén közötti “linker” peptid meg lett hosszabbítva.

Eredeti linker: GGGSGGSLEEC;

L1 linker: GELGGSGGSLEGGSGLEEC;

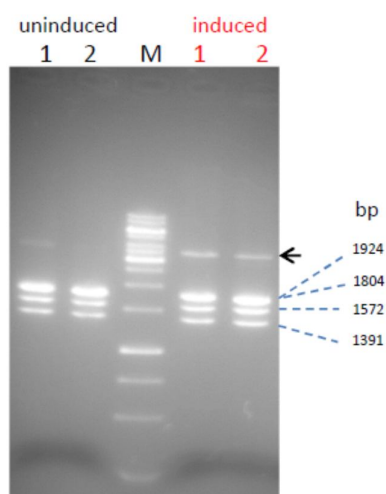
L11 linker: GGGSGGSLEGGSGLEGGSGLEEC.

¹pZdB-MSssI(T313H)L1, hiányzik a 6ZB kötőhely.

²pYB-MSssI(T313H), a targetrégió a plazmid más helyén van.

³Ezekben a plazmidokban a 6ZB kötőhely és a célzott AvaI hely sorrendje fordított (1. ábra alsó sor).

A 2. táblázatban feltüntetett plazmidok egy részének jellemzése még folyik. Az eddig levonható következtetések a 6ZB-MSssI fúziós fehérjét kódoló, pZB- jelű plazmidokkal kapott eredményekből származnak. Ezekben a szekvenciaspecifikus metiláció függött a 6ZB irányítódómén jelenlététől. Ha a 6ZB kötőhelyet más szekvenciával helyettesítettük (pZdB-MSssI(T313H)L1, 2. táblázat), megszűnt a specifikus metiláció. Ha a targetrégiót áthelyeztük a plazmid egy távoli helyére (pYB-MSssI(T313H)), a védett fragmentum mérete a várt módon változott.



2. ábra Helyspecifikus DNS-metiláció kimutatása restriktions enzim emésztéssel. A nyíl mutatja az indukció hatására megjelenő ~3700 bp-os fragmentumot, amely a targetrégióban lévő *Ava*I hely védettsége következtében jön létre, és az 1924-es és 1804-es fragmentumból áll.

- 1) pZB-MSssI(T313H)L1 - *Ava*I
- 2) pZB-MSssI(T313H)L1-T288 - *Ava*I
- M) Fermentas SM1163 marker

A restriktions védelmi teszt eredménye alapján több plazmidot ún. biszulfitos szekvenálással is megvizsgáltunk. Ezzel a módszerrel meghatározható, hogy egy-egy kiválasztott 400-500 bp-os régió (amplikonon) belül mely citozinok milyen gyakorisággal metilálódtak (Frommer et al., 1992).

A legfontosabb eredmények és az ezekből levonható következtetések:

1) Létrehoztunk egy kísérleti rendszert, amelynek segítségével *E. coli*-ban vizsgálható a cink-ujj fehérjék által irányított SssI MTáz specifitása, a kiváltott DNS metiláció szintje, kiterjedése. A plazmidok moduláris szerkezete lehetőséget ad a ZF irányítódómén, a MTáz és a targetrégió újabb változatainak viszonylag egyszerű kialakítására és a metilációs specifitás analízisére.

Sikerült olyan restriktációs enzimeket találni, amelyek alkalmasak a ZF kötőhelyek közelében lévő CpG helyek metilációs állapotának vizsgálatára. Bár a jelenség mechanizmusára vonatkozó hipotézisünk (csak az egyik szál metilálódik, a restriktációs enzimek nem egyformán érzékenyek a hemimetilációra, lásd fent) még igazolásra vár, eredményeink rámutattak arra az eddig tudomásunk szerint figyelmen kívül hagyott lehetőségre, hogy a ZF kötőhelyhez közeli CpG helynek valószínűleg csak az egyik szála fog metilálódni és ennek kimutatásához nem elég a mindkét szálon metilált helyre vonatkozó adatok alapján restriktációs enzimet választani. A hemimetiláció hatására vonatkozóan sokkal kevesebb adat áll rendelkezésre (REBASE, Roberts et al., 2015), ezért ezt az esetek többségében kísérletesen kell meghatározni.

2) A vizsgált M.SssI változatok metilációs specifikitásának szintje a következő volt:

T313H > C141S >> Q147L >> WT.

Tehát alacsony aktivitású enzim használatával növelhető az irányított metiláció specifikitása. Bár a T313H mutánsal nagyobb specifikitást kaptunk, mint a C141S-sel, a különbség a vártnál kisebbnek bizonyult. Ebből úgy tűnik, hogy az irányított metiláció specifikitása szempontjából fontosabb a MTáz aktivitás szintje, mint a DNS-hez való affinitás mértéke.

3) A célzott CpG hely 6ZB kötőhelytől mért távolságának hatását 5-től 32 bp-ig terjedő tartományon belül vizsgáltuk (1. ábra). Az 5 bp-ostól eltekintve valamennyi távolság esetében jól (~30-50%-ban) metilálódott a célhely, míg a plazmidon lévő más Aval helyek emésztődtek, nagyrészt metilálatlanok maradtak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az 5 bp távolság túl kicsi, viszont 7 bp-tól kezdve a vizsgált tartományon belül a metiláció mértéke hasonló volt, azaz a ZFP domén révén a DNS-hez kötődött SssI MTáz távolabbi CpG helyeket is képes "elérni". Ezt a biszulfitos szekvenálás is megerősítette. A célzott Aval helytől még 100-200 bp távolságra is találtunk metilált helyeket, sőt detektáltunk metilációt a targetrégió kívül, a 6ZB kötőhely „külső” oldalán. Ezek a megfigyelések, amelyek a DNS flexibilitása miatt nem is nagyon meglepőek, egyszersmind a módszerrel elérhető specifikitás korlátait is jelzik: egy bizonyos tartományon belül nem tudjuk a metilációt csak egyetlen kiválasztott CpG-re irányítani. A biszulfitos szekvenciameghatározás meglepő eredménye volt, hogy a T313H mutáns esetében – kis gyakorisággal – találtunk olyan klónokat, amelyekben a metilált citozin nem CG dinukleotidban volt. Ez arra utal, hogy a T313H csere rontja az enzim DNS szubsztrátfelismerő-képességének szigorúságát.

4) A ZF domén és MTáz közötti összekötő peptid (linker) hosszának hatását néhány N-terminális fúzió (6ZB-M.SssI) esetében vizsgáltuk. Az eredeti 6ZB-M.SssI fúzióban a linker peptid szekvenciája GGSGGS LEC. Ezt oligonukleotidok beépítésével a következőkre hosszabbítottuk:

GGSGGS LEGGSGLEC (L1-es változatok)

GGSGGS LEGGSGLEG GSGLEC (L11-es változatok) (2. táblázat).

A linker peptid L1-es hosszabbítása kissé fokozta a célzott Aval hely metilációjának gyakoriságát.

Az M.SssI-ZF fúziókkal kapott eredményeket leíró kézirat készülóban van. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy *E. coli*-ban a fuzionált ZF irányítódoménnal vezérelt T313H mutáns sokkal nagyobb metilációs specifitást tesz lehetővé, mint a vad típusú enzim. Azt, hogy ez emlős sejtekben is így van-e, jelenleg együttműködő holland partnereink (Marianne Rots, UMCG, Groningen) vizsgálják.

Az SssI MTáz citozin-dezaminációs aktivitása

Korábban néhány DNS-(citozin-5)-MTÁzról kimutatták, hogy ha az enzimet a metildonor S-adenozilmetionin (SAM) nélkül, csak DNS-sel inkubálják, akkor a MTáz a rá jellemző specifikus felismerőszekvenciában lévő szubsztrát citozint egy lassú reakcióban uracillá dezaminálja. Megvizsgáltuk, hogy az M.SssI képes-e erre a mellékreakcióra, továbbá azt is, hogy vajon tudja-e a C5-metilcitozint timinné dezaminálni. Ezt a munkát az a remény motiválta, hogy ha a $C \rightarrow U$ reakció sokkal gyorsabb lenne, mint az $m^5C \rightarrow T$ átalakulás, akkor ki lehetne fejleszteni egy módszert CG dinukleotidokban lévő metilált citozinok kimutatására. Egy ilyen módszer a DNS-metiláció kutatásában kulcsfontosságú, de sok technikai problémával terhelt biszulfitos szekvenálás enzimatis alternatívája lehetne.

Megállapítottuk, hogy az M.SssI képes a CG dinukleotidokban elhelyezkedő citozinokat *in vitro* uracillá dezaminálni, míg a metilált helyekkel (m^5CG/m^5CG) nem reagált kimutathatóan. A két reakció sebessége közötti különbség legalább akkora, mint amit a biszulfitos reakcióra leírtak. Sajnos ennek ellenére a M.SssI által katalizált reakció nem látszik versenyképesnek a biszulfitos dezaminálással, ugyanis az enzimatis $C \rightarrow U$ átalakulás sebessége, bár 5'-

amino-5'-deoxiadenozin hozzáadásával legalább egy nagyságrenddel növelhető volt, még így is túl lassú ahhoz, hogy használható módszer legyen. Előállítottuk az M.SssI egy olyan mutánsát (G19D), amely – feltehetően amiatt, hogy romlott az enzimnek a SAM metildonort kötő képessége - *E. coli* sejtekben, fiziológias SAM koncentráció mellett is képes citozin dezaminációra. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a G19D mutáns enzimet irányítódómenhez kapcsolva *in vivo* helyspecifikus mutagenézisre használjuk.

Az M.SssI citozin-dezaminációs aktivitását vizsgáló munkából egy közleményünk jelent meg (Stier and Kiss, 2013). Stier Ildikó, aki ennek az OTKA projektnek a résztvevője volt, részben ezekből az eredményekből írta meg PhD disszertációját, amelyet 2014 tavaszán védett meg.

Kísérlet egy *E. coli* rendszer létrehozására szekvenciaspecifikus DNS-kötő fehérjék vizsgálatához

Miután több esetben is a vártnál jóval kisebb metilációs specifitást kaptunk, felvetődött, hogy *E. coli*-ban a 6ZA és a 6ZB ZF fehérje nem működik úgy, ahogy várjuk. Ennek a vizsgálatára megkezdtük egy olyan, az *E. coli lac* rendszerén alapuló módszer létrehozását, amely alkalmas fehérjék helyspecifikus DNS-kötődésének tesztelésére *in vivo*. A módszer reményeink szerint alkalmas lesz bármilyen DNS-kötő fehérje vizsgálatára, amennyiben a kötőhely nukleotidszekvenciája ismert.

Irodalmi hivatkozások

Chaikind B., Kilambi, K.P., Gray, J.J. and Ostermeier, M. (2012) Targeted DNA Methylation Using an Artificially Bisected M.HhaI Fused to Zinc Fingers. *PloS ONE* **7**(9): e44852. doi:10.1371/journal.pone.0044852

Chaikind, B. and Ostermeier, M. (2014) Directed Evolution of Improved Zinc Finger Methyltransferases. *PLoS ONE* **9**(5): e96931. doi:10.1371/journal.pone. 0096931

Darii, M., Cherepanova, N., Subach, O., Kirsanova, O., Raskó, T., Ślaska-Kiss, K., Kiss, A., Deville-Bonne, D., Reboud-Ravaux, M. and Gromova, E. (2009) Mutational analysis of the CG recognizing DNA methyltransferase SssI: insight into enzyme-DNA interactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**: 1654-1662.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 1827–1831.

- Gommans, W.M., McLaughlin, P.M., Lindhout, B.I., Segal, D.J., Wiegman, D.J., Haisma, H.J., van der Zaal, B.J. and Rots, M.G. (2007) Engineering zinc finger protein transcription factors to downregulate the epithelial glycoprotein-2 promoter as a novel anti-cancer treatment. *Mol. Carcinog.*, **46**: 391-401.
- Meister, G.E., Chandrasegaran, S. and Ostermeier, M. (2008) An engineered split M.HhaI-zinc finger fusion lacks the intended methyltransferase specificity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**: 226-230.
- Nomura, W. and Barbas, C.F., III. (2007) In vivo site-specific DNA methylation with a designed sequence-enabled DNA methylase. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**: 8676-8677.
- Rathert, P., Raskó, T., Roth, M., Ślaska-Kiss, K., Pingoud, A., Kiss, A. and Jeltsch, A. (2007) Reversible inactivation of the CG specific SssI DNA (cytosine-C5)-methyltransferase with a photocleavable protecting group. *ChemBioChem*, **8**: 202-207.
- 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.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D. (2015) REBASE- A database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **43**: D298-D299 (2015).
- Ślaska-Kiss, K., Tímár, E. and Kiss, A. (2012) Complementation between inactive fragments of SssI DNA methyltransferase, *BMC Molecular Biology* **13**: 17.
- Stier, I. and Kiss, A (2013) Cytosine-to-Uracil Deamination by SssI DNA Methyltransferase. *PLoS ONE* **8**(10): e79003. doi:10.1371/journal.pone.0079003
- Xu, G.L. and Bestor, T.H. (1997) Cytosine methylation targetted to pre-determined sequences. *Nature Genet.*, **17**: 376-378.