

## **Analiza specyficzności metylotransferazy DNA EcoVIII oraz jej homologów**

Ewa Wons

Celem badań była analiza specyficzności substratowej bakteryjnych metylotransferaz DNA. Model badawczy stanowiła grupa czterech metylotransferaz DNA rozpoznających sekwencję nukleotydową 5'-AAGCTT-3'/3'-TTCGAAA-5' i katalizujących przeniesienie grupy metylowej na adeninę 5'. Analizowanymi enzymami były: M.EcoVIII z *Escherichia coli* E1585-68, M.HindIII z *Haemophilus influenzae* Rd, M.LlaCI z *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* W15 oraz M.BstZ1II z *Bacillus stearothermophilus* 14P. W przypadku tej ostatniej badano dwie izoformy enzymu – białko typu dzikiego oraz wariant delecyjny pozbawiony 60-aminokwasowego odcinka sąsiadującego z domeną rozpoznającą sekwencję specyficzną (TRD).

W pierwszym etapie badano oddziaływania specyficzne formowane pomiędzy badanymi metylotransferazami DNA a docelową sekwencją nukleotydową. Ustalono, że poszczególne zasady sekwencji kanonicznej nie są jednakowo istotne – oddziaływanie z sekwencją specyficzną jest w większym stopniu zaburzone, jeśli usunięte są kontakty z zasadami znajdującymi się w jej centrum niż z zasadami skrajnymi. Dotyczy to wszystkich badanych białek. W przypadku każdej analizowanej metylotransferazy DNA obserwowano rozluźnienie specyficzności (aktywność typu „star”), manifestujące się metylacją sekwencji nukleotydowych różniących się od kanonicznej pojedynczym podstawieniem pary zasad, w obecności rozpuszczalników neutralnych (DMSO, glicerol, etanol). Maksymalną aktywność typu „star” uzyskano stosując DMSO w stężeniu 30% dla M.EcoVIII i M.HindIII, 40% dla M.BstZ1II oraz 50% glicerol dla M.LlaCI. Aby dokładnie określić preferencje M.EcoVIII względem substratu przeprowadzono szczegółowe badania prowadzące do wyznaczenia parametrów kinetycznych dla każdej sekwencji drugorzędowej. Wykazano, że M.EcoVIII działa zgodnie z kinetyką Michaelis-Menten i wykazuje preferencję względem substratu hemimetylowanego ( $K_m=24,4$  nM). M.EcoVIII jako jedyny z badanych enzymów jest zdolny do modyfikacji sekwencji specyficznej niesionej na jednoniciowym DNA. Wydajność metylacji sekwencji drugorzędowych jak również sekwencji kanonicznej znajdującej się na jednoniciowym DNA waha się w granicach 0,09-0,22× poziomu uzyskanego dla niemetylowanej sekwencji specyficznej. W niniejszej pracy wykazano,

że w najwyższym stopniu modyfikowane są sekwencje drugorzędowe z podstawieniem I pary zasad, w najniższym III pary zasad.

Analiza oddziaływań ze szkieletem fosforanowo-cukrowym wykazała, że wiązania fosfodiesterowe pełnią znaczącą rolę w formowaniu kompleksu pomiędzy białkiem a DNA. Najważniejszą rolę zdają się pełnić wiązania pomiędzy zasadami w środku sekwencji, zwłaszcza pomiędzy G a C, C a T, T a T (wiązanie naprzeciw docelowej adeniny z drugiej nici) oraz wiązanie pomiędzy docelową adeniną a nukleotydem sąsiadującym od strony 5'. Usunięcie możliwości oddziaływania z którymkolwiek z nich skutkuje obniżeniem metylacji takiego substratu o co najmniej połowę. Usunięcie wiązania fosfodiesterowego poza sekwencją kanoniczną, ale w jej bliskim sąsiedztwie, również wpływa na poziom modyfikacji takiego substratu, co sugeruje, że oddziaływania ze szkieletem nie ograniczają się jedynie do obszaru sekwencji kanonicznej. Wariant delecyjny M.BstZ1IIIΔ jest w największym stopniu wrażliwy na utratę kontaktów ze szkieletem DNA, co uprawdopodobnia rolę wyciętego fragmentu w oddziaływaniach niespecyficznych. Metylotransferazy EcoVIII oraz BstZ1II są zdolne do modyfikacji sekwencji specyficznej ułożonej bezpośrednio na końcu cząsteczki DNA, jednocześnie trójnukleotydydowe flanki są wystarczające dla M.EcoVIII i M.BstZ1IIIΔ do pełnej metylacji takiego substratu. Analizowano również wpływ kontekstu nukleotydowego, w jakim sekwencja docelowa się znajduje, na poziom metylacji. Dla żadnego z badanych enzymów ciągi puryn nie są preferowanymi flankami.

W pracy wykazano, że metylotransferaza LlaCI jest zdolna do modyfikacji sekwencji specyficznej w hybrydzie RNA/DNA w warunkach typu „star”. Enzym modyfikuje tylko nić DNA hybrydu, a poziom metylacji takiego substratu jest o rząd wielkości niższy niż uzyskany dla dupleksu DNA. Ta niezwykła cecha ma potencjał aplikacyjny – umożliwia znakowanie hybrydów DNA/RNA.

W drugiej części pracy skupiono się na mapowaniu domeny wiążącej specyficzną sekwencję nukleotydową (TRD) M.EcoVIII. W tym celu wykonano systematyczną analizę szesnastu reszt aminokwasowych konserwowanych w obrębie domeny TRD homologicznych białek. Wykazano, że wymiana tych reszt na resztę alaniny (której łańcuch boczny składa się jedynie z węgla C-β) nie skutkowałą całkowitym zanikiem aktywności metylującej. Największy spadek aktywności (o 80-90%) obserwowano w przypadku mutantów W176A, L181A, E186A, P187A, W190A, Y195A, N214A i N227A, natomiast wymiana reszt K172, K193, P194 i T200 obniżała aktywność o nie więcej niż 20%.