

Venetianer Pál

az MTA rendes tagja

A GÉNSEBÉSZ MŰSZEREI: A RESTRIKCIÓS- MODIFIKÁCIÓS ENZIMEK

Elhangzott 1996. november 19-én

Mielőtt előadásom tárgyára térnék, szeretnék egy bevezető megjegyzést tenni. A kísérleti természettudományok terén tartott akadémiai székfoglaló előadások soha nem egy ember munkáján alapulnak, sokszor igen nagyszámú közreműködő neve olvasható az utolsóként vetített dián. Ez természetesen most is így lesz. A sok közreműködő közül azonban most előljáróban szeretném kiemelni munkatársam és barátom, *Kiss Antal* nevét, aki 1974-ben frissen végzett orvoscént csatlakozott munkacsoportomhoz, és ezzel kezdődött nálunk ennek a témának a kutatása, amely ma is az ő irányítása alatt folyik. Amit tehát ma elmondandó vagyok, abban neki oroszlánrésze volt, mind mauálisan, mind szellemileg.

Kilenc évvel ezelőtt tartott akadémiai levelező tagi székfoglaló előadásomat azzal a gondolattal kezdtem, hogy a molekuláris biológia nagy – dátumszerűen a Watson–Crick-modell megszületéséhez, 1953-hoz köthető – forradalmából a magyar tudomány úgyszólván kimaradt, viszont abba a – második molekuláris biológiai forradalomnak nevezhető – izgalmas szakaszba, amelyet a rekombinációs DNS-technológia vagy népszerű nevén génsebészeti megszületése jelentett, a magyar tudomány és benne én, illetve munkacsoportom már teljes intenzitással bekapcsolódhattunk. Ez a forradalom is meglepően pontosan időhöz köthető, 1972–73-ban történt. Technikai-módszertani szempontból

ennek legfontosabb előfeltétele a restrikciós endonukleáz enzimek felfedezése és hatásmódjuk megismerése volt. Pontosan emlékszem, hogy milyen inspiráló hatással volt rám a PNAS 1972 novemberi számának átlapozása, amelyben hat cikk foglalkozott ezzel a kérdéssel, amiről azonnal ismertetőt tartottam az intézetben, és elkezdtek az ezzel kapcsolatos munkát.

Ma a restrikciós-modifikációs enzimek előállításával egy évi 100–110 millió dolláros termelési értékű iparág foglalkozik, ezek az enzimek mindennemű géntechnológiai kutatás és kísérleti munka legfontosabb, nélkülözhetetlen eszközei, segédanyagai, az előadásom címével választott metafora szerint ezek a génszobrász műszerei, amelyek lehetővé teszik a DNS kezelhető méretű darabokká vágását meghatározott pontokon. Remélem, meg tudom Önöknek mutatni, hogy e gyakorlati fontosságuktól eltekintve is hallatlanul érdekes kutatási objektumok – még akkor is, ha az ember nem feltétlenül osztja Arthur Kornberg nézetét, aki szerint olyan enzim nincs a világon, amelyik ne volna nagyon érdekes („I have yet to see an enzyme that proves to be uninteresting”).

A történet 1952-ben kezdődött, amikor a molekuláris biológia egyik alapító atyja, Salvador Luria megfigyelt egy akkor megmagyarázhatatlannak tűnő jelenséget, amelyet fágrestrikciónak nevezett el. Ennek lényege, hogy egy bakteriofág fertőzőképessége függ az előéletétől: ugyanaz a fág az *Escherichia coli* B törzset sokkal hatékonyabban fertőzi, ha az előző generációban ugyancsak a B törzsen nőtt, és nem például a K törzsen. A dolog fordítva is igaz: a K törzsen nőtt fág a K törzset fertőzi sokkal hatékonyabban, mint a B-t. A jelenség magyarázatára egy akkor még fiatal svájci kutató, Werner Arber – később megérdemelt Nobel-díjjal honorált – munkássága kínált magyarázatot 1962-ben. Arber feltételezte, hogy a különböző baktériumtörzsek olyan törzs-, illetve fajspecifikus enzim párokkal rendelkeznek, amelyek egyik tagja a DNS bizonyos szekvenciaelemeit felismerve azokat kémiaiilag modifikálja, másik tagja pedig ugyanezeket a szekvenciaelemeket felismeri és hasítja, ha nincsenek modifikálva, de érintetlenül hagyja, ha modifikálva vannak. A megjósolt enzimek létének direkt bizonyítása sokáig váratott magára, mert a kutatás elsősorban az *E. coli* B és K törzsek enzimeire koncentrált, amelyekről ma már tudjuk, hogy a bonyolultabb és nehezebben jellemezhető, ún. I. típusúhoz tartoznak. A molekuláris biológiai kutatások eszközeiként kizárólag a II. típusú enzimek használatosak, és a mai előadásban is kizárólag ezekről lesz szó. Az első II. típusú restrikciós enzimet a hetvenes évek elején – a később szintén Nobel-díjjal jutalmazott – Hamilton Smith izolálta, és tőle származik az – az avatatlanok számára kissé furcsa és a biokémiai nomenklatúra-bizottságokat az örületbe kergető – nevezéktan, amely mára kiirthatatlanul elterjedt. Nyilván a nem molekuláris biológusok is hallották már, ahogy a bennfentesek dobálózhatnak a

Bam, Bep, Eco, Hind, Sac, Fok és más hasonló nevekkal, kérem, nézzék el, ha én is ezt fogom használni, ezek a nevek egyszerűen az enzim forrását jelölik, a baktérium latin nevének rövidítése, amelyből az enzimet izolálták.

Ezen enzim párok egyik tagja tehát a restrikciós endonukleáz enzim (R), amely a DNS egy 4-8 bázispár hosszúságú, többnyire szimmetrikus szekvenciaelemét nagy pontossággal felismeri, és a felismerő szekvencián belül, vagy annak közvetlen közelében, pontosan meghatározott módon, endonukleolitikusan elhasítja. Az enzim pár másik tagja a modifikációs metiláz vagy DNS metiltranszferáz (M), amely ugyanazt a szekvenciaelemet ismeri fel, és arra mindkét szálon egy-egy metilcsoportot visz. Az így metilált DNS-t viszont a restrikciós endonukleáz már nem képes elhasítani.

Mint már említettem, mi a hetvenes évek első felében kezdtünk e területtel foglalkozni, ekkor már az irodalomban 5-6 különböző, II. típusú RM enzim párt jellemeztek, feltételezhető volt, hogy létezik még sok-sok eltérő specifitás is, és ismert volt ezen enzimek óriási lehetősége a DNS méretre szabdalásában, az akkor születő rekombináns DNS-technológiában. Kereskedelmi szinten még az ismert enzimek sem voltak hozzáférhetők. Nyilvánvaló volt: minél több különböző specifitású restrikciós enzimmel rendelkezik egy laboratórium, annál sokoldalúbb, jobb lehetőségei vannak a génmanipulációs kutatásban. Ebből kiindulva adtam azt a feladatot új munkatársamnak, Kiss Antalnak, hogy nézze meg: tartalmaz-e restrikciós endonukleázt a szomszéd Genetikai Intézetben behatóan vizsgált *Rhizobium meliloti* baktérium.

Ez a keresés ugyan eredménytelen volt, de egy szerencsés véletlen, illetve – mivel Pasteurtól tudjuk, hogy a véletlen csak a felkészült és jó szemű kutatót segíti – Kiss Antal alaposága és szívóssága egy a vizsgált kultúrákat szennyező baktériumban, amelyet a néhai Ivanovics György azonosított *Bacillus sphaericus*-ként, megtalált és felfedezett egy új enzimet, a *Bsp*RI restrikciós endonukleázt (1). Az enzim specifitásban ugyan megegyezett egy akkor már ismert enzimmal, a *Hae*III-mal, de több igen előnyös tulajdonsággal rendelkezett, rendkívül stabil volt, szinte agyon sem lehetett verni, és szokatlanul nagy mennyiségben fordult elő a baktériumban, így igen könnyű volt a tisztítása. Az enzimet Koncz Csaba homogenitással tisztította és alaposan jellemezte, párjával, a *Bsp* metilázsal együtt (2). Az e munkában szerzett tapasztalatokra támaszkodva csoportunkban ekkor elkezdtük a már ismert ilyen típusú enzimek egyre növekvő számának házilagos preparálását, részben saját munkánk segítségével, részben kereskedelmi célból. E gyakorlati rutinmunka során a későbbiekben még néhány új enzimet fedeztünk fel, így *Brevibacterium epidermidis*-ben *Bep*I enzimet (3) és *Bacillus cereus*-ban a teljesen egyedi specifitású, különleges tulajdonságokkal rendelkező *Bce*II enzimet (4), amelyeket Orosz András segít-

ségével jellemeztünk. Inkább mulatságos epizódként említhetem az úgynevezett X enzimet. Ezt jénai kollégánk, Manfred Hartmann izolálta – ugyancsak véletlenül, egy szennyező, ismeretlen baktériumtörzsből –, s én jellemeztem, határoztam meg a felismerő specifitást. Mikor az eredményt közölni akartuk, Hartmann szomorúan közölte, hogy a törzs kipusztult, nem sikerült újraéleszteni. A tiszta enzimet még évekig használtuk, és noha azóta az ismert restriktív enzimek száma közelíti a 3000-et, a különböző specifitások száma meghaladja a 200-at, az X enzim máig vár az újrafelfedezésre, ilyen specifitású enzimet senki más nem talált azóta sem.

A különböző restriktív endonukleázokkal végzett rutinmunka során egyre jobban kezdtek érdekelni ezek az enzimek, nemcsak mint eszközök a kutatómunkában, hanem mint a kutatás céljai is. Felvetettük, hogy érdemes volna vizsgálni ezen enzimek biológiai szerepét, az enzimrendszerek genetikai szerveződését, szintézisük szabályozását, szerkezetüket, nagyfokú specifitásuk szerkezeti alapjait, működésmódjukat.

Az akkor még új – a hetvenes évek végén járunk – génklónozási technika kínálta az első támadáspontot: célul tűztük ki az általunk felfedezett *Bsp*RI enzimpár géneinek klónozását. E cél elérésére Kis Antal rendkívül szellemes ötleten alapuló biológiai szelekciós módszert javasolt, amelyet Szomolányi Éva segítségével ki is próbáltunk, és felhasználásával sikerrel klónoztuk, először a *Bsp* modifikációs metilázt (5). A módszert nem kívánom itt részletesen ismertetni, de elmondom, hogy azóta mindenki, aki valaha restriktív-modifikációs enzimeket klónozott, ezt – az irodalomba „magyar trükk” néven bevonult – módszert alkalmazza, és valamennyi gyártó cég is ezzel a módszerrel klónozott gének segítségével termelteti a restriktív és modifikációs enzimeket. Ha akkor eszünkbe jut a szabadalmaztatás és meg is tudjuk valósítani, akkor ma sem a munkacsoportunk, sem mi nem küzdenénk anyagi gondokkal.

A gén klónozása után Pósfai György meghatározta a gén és következőképpen az általa kódolt enzim teljes szekvenciáját (6). Ezt az első példát azután sok más követte. Klónoztuk és szekvenáltuk a *Bsp*RI után a *Bsu*RI (8), *SPR* (7), *Eca*I (10), *Bep*I (9), *Sau*96I (11), *Kpn*I (12) metilázok géneit. Itt szeretném megjegyezni, hogy a „magyar trükk” a metilázok működésén alapul, direkt módon tehát csak azok klónozására alkalmas. Minthogy azonban mai ismereteink szerint minden restriktív endonukleáz-modifikációs metiláz enzimpár géneje kapcsolt, egymás mellett helyezkedik el a kromoszómán, ezért ha elég nagy DNS-fragmentumot klónozzunk, akkor a metilázra történő szelekcióval klónozható a kapcsolt nukleázgén is. Ezt a lehetőséget szintén Kiss Antal használta ki a világon elsőnek a *Bsu*RI endonukleázgén klónozásával (8). E génpár szekvenálását a Nobel-díjas Richard J. Roberts laboratóriumával kooperálva

végeztük el úgy, hogy Pósfai György Szegeden szekvenálta a metiláz, míg Kiss Antal Cold Spring Harborban a nukleáz. Hasonló technikával később egy másik enzim, illetve génpár, a *Sau96I* rendszer klónozását és teljes szekvenálását Szilák László végezte el itthon, csoportunkban (11).

Első metilázgén-szekvenciánk eredményei alapján felismertük a fehérjék közös szekvenciaelemeit. E felismerés eredményeinek kibontakoztatása évekkel később az SZBK Biofizikai Intézetének matematikusa, Pósfai János nevéhez fűződik, aki az általa kidolgozott új algoritmus alapján Roberts laboratóriumában megállapította a legkülönbözőbb felismerő szekvenciájú 5-citozin metilázok szerkezeti homológiájának törvényszerűségeit. Itt magyarázatképpen meg kell jegyezni, hogy a katalizált kémiai reakció, illetve a DNS-ben metilált akceptor természete szerint a II. típusú modifikációs metilázok három csoportba sorolhatók:

1. A citozint az 5. szénatomon metiláló enzimek (idetartozik az általunk tanulmányozott enzimek többsége).
2. A citozin 4. helyzetű aminocsoportját metiláló enzimek.
3. Az adenin 6. helyzetű aminocsoportját metiláló enzimek.

A két utóbbi csoportban található szekvenciaazonosságok jóval csekélyebbek és nehezebben felismerhetők, elrendezésük, sorrendjük is változó. Pósfai János az első csoporthoz tartozó enzimekben 10 közös, hasonló szekvenciamotívumot ismert fel, mindig azonos elrendezésben. A VIII. és IX. blokkok közötti hosszabb egyedi szekvencia az úgynevezett szekvencia-felismerő régió (TRD = target recognizing domain). Itt kell megjegyezni, hogy ismeretes ennek az enzimcsoportnak egy érdekes altípusa, a multispecifikus metilázoké. Ezeknek többségét Thomas Trautner berlini munkacsoportja fedezte fel és tanulmányozta, ide tartozik az először általunk azonosított és szekvenált SPR metiláz is. A multispecifikus metilázok TRD régiója jóval hosszabb a monospecifikusokénál, és ebben a TRD régióban funkcionálisan és szerkezetileg jól elkülöníthetők az egyes specifikusokért felelős egyedi szekvencia-felismerő régiók.

Az elmúlt másfél évtized során klónozott és szekvenált metiláz és nukleáz génjeink segítségével még sok érdekes eredményt nyertünk. Így például a *BspRI* metiláz génjét Fehér Zsigmond bevitte élesztőbe, amelynek DNS-e természetes állapotban egyáltalán nem tartalmaz metilcsoportokat. Sikertült kimutatni ebben a heterológ gazdasejtben az enzim működését és egyes élesztőgének szelektív metilálását (13).

Megfelelő vektorokkal túltermeltettük és homogenitásig tisztítottuk a klónozott enzimek többségét (12, 14, 15), néhányukat alaposan jellemeztük enzimológiai szempontból, megismerve több érdekes tulajdonságukat. Szilák László egy adenin-metiláz, az *EcaI* és az 5-citozin-metiláz *BspRI* enzimo-

lógiját, a katalizált reakció kinetikáját vizsgálta alaposan és hasonlította össze, ennek ismertetésétől itt eltekintek (15, 16).

Kiemelném azonban Pósfai György újszerű és meglepő megfigyelését, azt, hogy a metilázok képesek intermolekuláris komplementációra (17). Ez azt jelenti, hogy a molekula önmagában inaktív N-terminális és C-terminális fele mind *in vitro*, mind *in vivo* együttesen képes véghezvinni az enzímreakciót, anélkül, hogy kovalensen össze volnának kapcsolva. Ilyen komplementációt először Ullmann Ágnes mutatott ki 30 évvel ezelőtt a β -galaktozidáznál, ennek óriási jelentősége is lett a molekuláris biológiában, de azóta is nagyon kevés hasonló esetről tud az irodalom. Pósfai azt is kimutatta, hogy ez a komplementáció két nagymértékben homológ és azonos felismerő specifitású, de különböző fajokból származó enzim, a *Bsp*RI és *Bsu*RI között is működik. Érdekes adat, hogy holland kutatók felfedeztek egy metilázt, az *Aqu*I enzimet, amely természetes állapotában is két lánc hasonló jellegű komplementációjával működik.

Szilák László és Finta Csaba kimutatták, hogy a *Bsp*RI metiláz enzim képes önmagát is metilálni az aktív centrum ciszteinjén és kisebb mértékben még egy másik ciszteinen, és ezzel részleges öngyilkosságot elkövetni (18). Ennek a jelenségnek a biológiai szerepéről semmit sem tudunk, noha némi formai analógiát mutat az Ada O^6 -metilguanin-DNS-metiltranszferáz működésével. Ennek az enzimnek normális funkciója az, hogy saját magát metilálja, és ezzel további működését megbénítja, tehát a szó szoros értelmében nem is biztos, hogy enzimnek tekintendő.

Természetesen az utóbbi másfél évtizedben, a mi első eredményeink megszületése óta, igen nagyszámú – több mint száz – II. típusú restrikciós-modifikációs enzim primér szekvenciája vált ismertté, ismerjük továbbá öt nukleáz (*Eco*RI, *Eco*RV, *Bam*HI, *Pvu*II, *Fok*I) és négy metiláz (*Hha*I, *Taq*I, *Pvu*II, *Hae*III) röntgendiffrakcióval megállapított teljes háromdimenziós szerkezetét is. Ennek alapján megfogalmazható néhány általános szabályszerűség:

1. Az azonos felismerő szekvenciájú metiláz, illetve nukleáz enzimpárok között semmiféle szerkezeti hasonlóság, homológia nincsen, alegységszerkezetük is különböző (a nukleázok dimerek a metilázok monomerek). Nyilvánvalóan teljesen más mechanizmussal, más kölcsönhatásokkal ismerik fel a megfelelő szekvenciákat.

2. Az ismert nukleázszekvenciákban általában nem ismerhető fel hasonlóság, még azonos DNS-felismerő szekvenciájú enzimek esetén sem. A térbeli szerkezetben azonban a *Bam*HI, illetve *Eco*RI endonukleázok, a különböző felismerő szekvencia és primér szerkezet ellenére sok hasonlóságot mutatnak. Ez a jelenség konvergens evolúcióra utalhat.

3. A metilázok között bizonyos szekvencia hasonlóságok vannak. Mint már erről szó esett, ezek elég kicsik az aminocsoportot metiláló két enzimtípusnál, viszont igen széles körűek az 5-citozin-metilázoknál. A metilázok közül elsőként egy 5-citozin-metiláz, a *HhaI* enzim teljes háromdimenziós szerkezete vált ismertté. Az adenin-metiláz *TaqI* szerkezete viszont, a kevésbé hasonló primer szerkezet ellenére, meglehetősen hasonlónak bizonyult. E hasonlóság fényében újrazivsgálva a primer szekvenciákat, kiderült, hogy kevésbé manifeszt formában az adenin és 4-citozin-metilázok szerkezetében is megtalálható a Pósfai János által a másik csoportban felismert 10 motívum közül 9, csak éppen a sorrendjük más, mintegy cirkulárisan permutált sorrendben vannak jelen.

A restrikciós-modifikációs enzimrendszerek szerkezetkutatása terén a legizgalmasabb felismerést a *HhaI* enzim térszerkezetének megismerése hozta 1994-ben.

A binér enzim-szubsztrát (AdoMet), illetve a ternér enzim-DNS-AdoMet komplex térbeli szerkezete körülbelül megfelel annak, ami a primer szekvenciahomológiák, enzimológiai kísérletek és irányított mutagenesis-vizsgálatok alapján bennünk kialakult az 5-metilcitozin-metilázokról. Az enzim-molekula két doménból áll, a nagyobb, katalitikus és kofaktorkötő domén, valamint a kisebb, DNS-felismerő domén. A DNS-felismerő doménban két glicingazdag felszíni hurok érintkezik a DNS nagy árkával a felismerő szekvenciában, és ez a két hurok a primer szekvencia által jósolt egyedi, TRD, azaz szekvencia-felismerő régióban van. Ebben a doménban van ezenkívül a Pósfai János által felismert konzervált motívumok közül a IX. is. Ez a motívum mintegy gerinc fogja össze a kis domén egészét. Az I. és X. motívumok a metildonor SAM (S-adenozil-metionin) megkötésében vesznek részt. A IV. és VI. motívumok (és kevésbé hangsúlyosan a VII. és VIII. motívumok is) tehetők felelőssé a katalitikus aktivitásért, a IV. motívumban van az a cisztein, amely az 5-metilcitozin-metilázok esetében bizonyítottan részt vesz a katalízis intermediérjének képzésében, és amelyről a *BspRI* metiláz esetében megállapítottuk, hogy tartós kovalens kötéssel is metilálhat, ha nincs jelen a DNS szubsztrát. A VI. igen erősen konzervált motívum szerepe az, hogy megfelelően pozicionálja a katalitikus centrumot tartalmazó IV. motívumot.

Mindez egyáltalán nem meglepő. Meglepőnek az bizonyult, amikor kiderült, hogy mi történik az enzimreakció során. Ekkor ugyanis a kölcsönhatás révén nem egyszerűen meghajlik a DNS, amint pl. egyes nukleázreakcióknál történik, hanem a felismerő szekvenciában lévő, metilálendő citozin teljes egészében kifordul a kettősspirál-szerkezetből, mélyen behatolva az enzim „zseb”-ébe, miközben az enzim katalitikus centrumát tartalmazó IV. motívum

közel 180° -kal elfordulva hozza egymás közelébe az aktív ciszteint és a citozint. Eközben a citozin helyébe ideiglenesen behatol egy glutamin és egy szerin oldallánc az enzim molekulából. A DNS-szerkezetnek ez az extrém torzulása, egy bázis teljes kifordulása, teljesen új jelenség, ami meglepő módon még energiát sem igényel. Roberts egy elméleti cikkében megjósolta, hogy valószínűen más enzimekről is ki fog derülni, hogy hasonló módon működnek. Ez a predikció fényesen beigazolódtott, az elmúlt héten jelent meg a *Nature*-ben az a közlemény, amely az uracil-DNS-glikoziláz enzimről mutatja ki, hogy hasonlóan működik, a DNS-szerkezetben a hibát jelentő uracil jelenlétét felismerve kötődik, és a kötődés során az uracil kifordul a láncból, míg az enzim két aminosava behatol a helyére. A kifordult bázist azután lehasítja az enzim. Érdekes, hogy míg a *HhaI* metilázban az enzim a DNS nagy árka felől támad, addig az uracil-DNS-glikozilázban ugyanez a mechanizmus a kis árokból támadó enzim segítségével valósul meg.

Sokat foglalkoztunk mi is és mások is azzal a problémával, hogy mik azok a strukturális tényezők, amelyek ezen enzimek igen nagyfokú szekvenciaspecifitását determinálják, és hogyan lehet ezt irányított módon megváltoztatni, azaz új specifikus enzimeket mesterségesen előállítani.

Először is érdemes kvantitatívan jellemezni, hogy mit jelent a specifitás. A nukleázok esetében egy hat bázispárból álló felismerőhely egyetlen bázispárjának megváltoztatása az enzim hasítási sebességét legalább egymilliószorosan csökkenti, de egyes esetekben ez a tényező akár 10^9 is lehet. A metilázok esetében ilyen pontos kvantitatív adatok nem állnak rendelkezésre, de a specifitás biztosan itt is igen nagyfokú.

A fentiekben nagyon vázlatosan ismertetett térszerkezeti kép alapján arra a következtetésre lehet jutni, hogy az enzimspecifitás megváltoztatásához a variábilis TRD régió és esetleg a IX. motívum megváltoztatása szükséges. Noha ezt biztosan csak két éve tudjuk, már jóval régebben ebből a hipotézisből kiindulva próbáltunk, mi is és más csoportok is, mutagenézissel, illetőleg chimaera enzimek létrehozásával, a TRD régió vagy annak egyes szakaszainak áthelyezésével új specifikus enzimeket létrehozni. A multispecifikus metilázoknál Trautner és munkatársai sikeresek voltak. Ezeknél az enzimeknél – feltehetően a rugalmasabb térszerkezetnek köszönhetően – a TRD régió belül az egyes specifikusokat determináló, jól definiált felismerő szakaszok szinte tetszés szerint helyezhetők át, távolíthatók el funkciójuk megőrzésével, illetve a többi specifikus determinánsok érintetlenül hagyásával. Így új specifikus kombinációk létrehozása megoldottnak tekinthető. Nem így van ez a monospecifikus enzimeknél, ahol sok éves próbálkozásaink irányított mutagenézissel, meghatározott szakaszok átültetésével, illetve tervezett chimaerák létrehozásával mind

sikertelennek bizonyultak. Első ízben Roberts laboratóriumában sikerült egy megváltozott specifitású chimaera létrehozása a *HhaI* és a *HpaII* enzimek között 1991-ben. Ezek a kísérletek is azt bizonyítják, hogy a specifitást a TRD régió és a IX. motívum determinálják. Mi az irányított, tervezett átalakítási kísérletek kudarca után újabban megpróbálkoztunk egy másik megközelítéssel, amely a véletlen mutagenézisen és szelekción alapul. Ezzel az elmúlt év során már biztató eredmények születtek. E kísérletek célja: a GGA/TCC specifitású *SinI* metiláz átalakítása a lazább specifitású, azaz több DNS-szekvenciát modifikáló GGNCC felismerő helyű *Sau96I* specifitássá. Ebből a célból Kiss Antal, Pósfai György és Zsurka Gábor beállítottak egy nagy hatékonyságú szelekciós módszert, véletlenszerűen mutagenizálták a *SinI* metilázgén egy kiválasztott szakaszát, majd a mutagenizált gént hordozó *E. coli* klónok között szelektáltak a *Sau96I* metiláló specifitás megjelenésére. Sikerült is ilyen klónokat találni, és ezek vizsgálata megerősítette, hogy valóban – ha csekély aktivitással is, de – megjelent az új specifitás, a mutánsok a *SinI* specifitás teljes megőrzése mellett képesek voltak metilálni a GGGCC, illetve GGCCC szekvenciákat is. A mutánsok szekvenciájának analízise azonban a várakozástól eltérő eredményeket adott, a specifitást megváltoztató mutációk nem a TRD régióban és nem is a IX. motívumban helyezkedtek el. Ez a munka természetesen nincs még lezárva, folytatjuk a további mutánsok keresését és vizsgálatát.

Mindezen eredmények azt látszanak igazolni – összhangban más kísérleti rendszereken nyert fehérje-engineering-tapasztalatokkal –, hogy az enzim-specifitás – egyes kivételes esetektől eltekintve, mint például a multispecifikus metilázok – még akkor is, ha lényegében az enzim egy rövid, jól definiált régiójával van determinálva, azaz a DNS megfelelő szekvenciájával csak ez a régió áll közvetlen kapcsolatban, általában számos egyéb kölcsönhatás által van befolyásolva. Ez azt jelenti tehát, hogy vagy más helyeken történő mutációkkal is megváltoztatható, vagy hiába cseréljük ki a determináló elemet, ez csak akkor vezet specifitásváltozáshoz, ha másutt is végrehajtunk változásokat.

Más szavakkal: hiába áll rendelkezésünkre a csodálatos manipulációs eszköztár, az evolúció hatékonyságával nem tudunk egyelőre versenyezni. Persze azért megpróbáljuk. Remélem, amikor valamelyik munkatársam fog itt állni, székfoglalót tartani, ő már több sikerről számolhat be ebben a versenyben. Én ugyan nem hiszem, hogy – egy nagy sikerű könyv címével szólva – a molekuláris biológus istent játszik, amikor ebben a versenyben részt vesz, de ilyen nagy szavak használata nélkül is izgalmas a kihívás, elég ahhoz, hogy feladatot adjon számunkra a jövőben is.

Előadásom végére érvén bocsássák meg, ha ismét magamat idézem. Levelező tagi székfoglalóm végén azt mondtam, hogy az ott elmondottak azt illusztr-

rálják, hogy egy tisztán alapkutatói probléma hogyan vezethet gyakorlati fontosságú, alkalmazott eredményekhez. Az imént ismertetett munkával a fordított utat jártuk be: egy gyakorlati-technikai szükséglet, amit részben a hazai szegénység tett igazán szükségletté, indított el egy olyan kutatói irányt, amelyben talán fontos alapkutatói, elméleti eredményeket sikerült elérnünk.

Mint a bevezetésben említettem, az itt elhangzottak igen sok kutató munkáját foglalják össze. Befejezésül hálás köszönetet szeretnék mondani mindazoknak, akik az elmúlt közel negyedszázadban ezen a témán dolgoztak az SZBK Biokémiai Intéztében az én munkacsoportomban, illetve az utóbbi években már elsősorban Kiss Antal irányítása alatt; továbbá mindazoknak, akikkel e munka egyes szakaszaiban együttműködünk. A legfontosabb, legmelegebb köszönet és hála szavai azonban azt az embert illetik, aki már nincs közöttünk. Levelező tagi székhelyemmel még itt ült az első sorban szeretett mesterem, Straub F. Brunó. Akkor csak magánlevélben mondtam neki köszönetet, mert úgy éreztem, nyilvánosan ez hízelgésnek hatna, amit sosem szerettem. Most azonban – fájdalom – már nyugodtan kimondhatom, hogy mindazt, amit a pályámon elértem, elsősorban neki köszönhetem, ezt az előadást az ő emlékének ajánlom.

Irodalom

1. Kiss, A., Sain, B., Csordás-Toth, É., Venetianer, P.: A new sequence-specific endonuclease (*Bsp*) from *Bacillus sphaericus*. *Gene*, 1 (1977) 323–329.
2. Koncz, C., Kiss, A., Venetianer, P.: Biochemical characterization of the restriction-modification system of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Biochem.*, 89 (1978) 523–529.
3. Venetianer, P., Orosz, A.: *BepI* restriction endonuclease, a new isochisomer of *FnuDII*. *Nucleic Acids Res.*, 16 (1988) 350.
4. Venetianer, P., Orosz, A.: *BceFI*, a new Type IIS restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 16 (1988) 3053–3060.
5. Szomolanyi, E., Kiss, A., Venetianer, P.: Cloning the modification methylase gene of *Bacillus sphaericus*R in *E. coli*. *Gene*, 10 (1980) 219–225.
6. Posfai, G., Kiss, A., Erdei, S., Posfai, J., Venetianer, P.: Structure of the *Bacillus sphaericus*R modification methylase gene. *J. Mol. Biol.*, 170 (1983) 597–610.
7. Posfai, G., Baldauf, F., Erdei, S., Posfai, J., Venetianer, P., Kiss, A.: Structure of the gene coding for the sequence-specific DNA methyltransferase of the *B. subtilis* phage SPR. *Nucleic Acids Res.*, 12 (1984) 9039–9049.
8. Kiss, A., Posfai, G., Keller, C. C., Venetianer, P., Roberts, R. J.: Nucleotide sequence of the *BsuRI* restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.*, 13 (1985) 6403–6421.
9. Kupper, D., Zhou, J.-G., Venetianer, P., Kiss, A.: Cloning and structure of the *BepI* modification methylase. *Nucleic Acids Res.*, 17 (1989) 1077–1088.

10. Brenner, V., Venetianer, P., Kiss, A.: Cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the *EcoI* DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 18 (1990) 355–359.
11. Szilák, L., Venetianer, P., Kiss, A.: Cloning and nucleotide sequence of the genes coding for the *Sau96I* restriction and modification enzymes. *Nucleic Acids Res.*, 18 (1990) 4659–4664.
12. Finta, C., Sulima, U., Venetianer, P., Kiss, A.: Purification of the *KpnI* DNA methyltransferase and photolabeling of the enzyme with S-adenosyl-L-methionine. *Gene*, 164 (1995) 65–69.
13. Feher, Z., Kiss, A., Venetianer, P.: Expression of a bacterial modification methylase gene in yeast. *Nature*, 302 (1983) 266–268.
14. Posfai, G., Kiss, A., Venetianer, P.: Overproduction of the *Bacillus sphaericus*R modification methylase in *Escherichia coli*, and its purification to homogeneity. *Gene*, 50 (1986) 63–67.
15. Szilák, L., Venetianer, P., Kiss, A.: Purification and biochemical characterization of the *EcoI* DNA methyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, 209 (1992) 391–397.
16. Szilák, L., Dér, A., Deák, F., Venetianer, P.: Kinetic characterization of the *EcoI* methyltransferase. *Eur. J. Biochem.*, 218 (1993) 727–733.
17. Posfai, G., Kim, S. C., Szilák, L., Kovacs, A., Venetianer, P.: Complementation by detached parts of GGCC-specific DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Res.*, 19 (1991) 4843–4847.
18. Szilák, L., Finta, C., Patthy, A., Venetianer, P., Kiss, A.: Self-methylation of *EspRI* DNA-methyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 2876–2881.