

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS**

Mindaugas Zaremba

**TETRAMERINĖS RESTRIKCIJOS ENDONUKLEAZĖS
Bse634I STRUKTŪROS, STABILUMO IR FUNKCIJOS
RYŠYS**

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P), baltymai, enzimologija (P310)

Vilnius, 2006

Disertacija rengta 2001–2006 metais Biotechnologijos institute.

Disertacija ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas:

prof. dr. Virginijus Šikšnys (Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, baltymai, enzimologija - P310)

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, baltymai, enzimologija - P310)

Nariai:

prof. dr. (HP) Vida Kirvelienė (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, nukleorūgštys, baltymų sintezė - P320)

prof. habil. dr. Gervydas Dienys (Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, chemija - 03 P, organinė chemija - P390)

habil. dr. Rimantas Nivinskas (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, baltymai, enzimologija - P310)

prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Chemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, baltymai, enzimologija - P310)

Oponentai:

prof. habil. dr. Saulius Klimašauskas (Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, baltymai, enzimologija - P310)

prof. habil. dr. Alfred Pingoud (Gyseno universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P, baltymai, enzimologija - P310)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2006 m. spalio mėn. 26 d. 11 val. Biotechnologijos Instituto aktų salėje

Adresas: Graičiūno 8, LT – 02241, Vilnius, Lietuva

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2006 m. rugsėjo mėn. 26 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Biotechnologijos Instituto ir Vilniaus Universiteto bibliotekose

**VILNIUS UNIVERSITY
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY**

Mindaugas Zaremba

**STRUCTURE - STABILITY - FUNCTION
CORRELATIONS WITHIN THE TETRAMERIC
RESTRICTION ENDONUCLEASE Bse634I**

Summary of doctoral dissertation

Physical sciences, biochemistry (04 P), proteins, enzymology (P310)

Vilnius, 2006

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology from 2001 to 2006.

Supervisor:

prof. dr. Virginijus Šikšnys (Institute of Biotechnology, physical sciences, biochemistry - 04 P, proteins, enzymology - P310)

Evaluation board of dissertation of Biochemistry trend:

Chairman:

prof. habil. dr. Kęstutis Sasnauskas (Institute of Biotechnology, physical sciences, biochemistry - 04 P, proteins, enzymology - P310)

Members:

prof. habil. dr. Vida Kirvelienė (Vilnius university, physical sciences, biochemistry - 04 P, nucleic acids, protein synthesis - P320)

prof. habil. dr. Gervydas Dienys (Institute of Biotechnology, physical sciences, chemistry - 03 P, organic chemistry - P390)

habil. dr. Rimantas Nivinskas (Institute of Biochemistry, physical sciences, biochemistry - 04 P, proteins, enzymology - P310)

prof. habil. dr. Albertas Malinauskas (Institute of Chemistry, physical sciences, biochemistry - 04 P, proteins, enzymology - P310)

Official opponents:

prof. habil. dr. Saulius Klimašauskas (Institute of Biotechnology, physical sciences, biochemistry - 04 P, proteins, enzymology - P310)

prof. habil. dr. Alfred Pingoud (Giessen university, physical sciences, biochemistry - 04 P, proteins, enzymology - P310)

The thesis defence will take place on 26th of October, 2006, 11 A.M. at the Institute of Biotechnology, Graičiūno 8, LT-02241, Vilnius, Lithuania.

The summary of the thesis was distributed on 26th of September, 2006.

The thesis is available at the Library of Institute of Biotechnology and at the Library of Vilnius University.

TURINYS

IVADAS	6
TYRIMŲ METODIKA	8
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	12
1. Tetramerinės restrikcijos endonukleazės Bse634I pavertimas dimerine	12
1.1. Dimerinės Bse634I formos konstravimas	13
1.2. Oligomerinės būsenos tyrimas gelfiltracijos ir analitinio ultracentrifūgavimo metodais	13
1.3. Oligomerinės būsenos ir stabilumo priklausomybės tyrimas	13
1.3.1. Cheminė denatūracija	13
1.3.2. Negrįžtama terminė inaktyvacija	16
1.3.3. Dalinė proteolizė	17
1.4. Wt Bse634I ir W228A mutanto sąveikos su DNR tyrimas	18
1.5. Plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I ir W228A mutantu	20
1.5.1. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė W228A mutantu	20
1.5.2. Vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I	22
1.5.3. Du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I	23
1.5.4. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR karpymo wt Bse634I mechanizmai	25
1.6. Imobilizuotos DNR hidrolizė wt Bse634I ir W228A mutantu	26
1.6.1. Imobilizuotos DNR hidrolizės aktyvacija	28
1.6.2. Reakcijos produktas aktyvuoja specifinės DNR karpymą wt Bse634I fermentu	29
1.7. DNR produktas neaktyvuoja nekanoninių taikinių karpymo wt Bse634I	30
1.8. Restrikcijos endonukleazės Bse634I katalitinio aktyvumo reguliacijos mechanizmas	30
2. Alosterinis komunikacijos tinklas tetramerinėje restrikcijos endonukleazėje Bse634I	32
2.1. Mutantų konstravimas ir atranka	32
2.2. Kinetinių savybių tyrimas	33
2.2.1. Bse634I sąveika su vienu atpažinimo taikiniu: imobilizuoto DNR segtuko hidrolizė	34
2.2.2. Bse634I sąveika su dviem atpažinimo taikiniiais: DNR segtuko hidrolizė tirpale	37
2.2.3. Plazmidinės DNR karpymas	38
2.3. Komunikacinės sąveikos tarp pirminių Bse634I dimerų	42
IŠVADOS	44
CONCLUSIONS	45
PADĖKA	46
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	47
DUOMENYS APIE AUTORIŲ	48
SUMMARY	49

IVADAS

II tipo restrikcijos endonukleazės atpažįsta trumpas 4-8 bazių porų DNR sekas ir perkerpa abi DNR grandines atpažinimo taikinyje ar greta jo. Šie fermentai yra bakterijų ir archebakterijų restrikcijos-modifikacijos sistemų, kurios apsaugo ląstelę nuo bakteriofagų infekcijos ar kitos „svetimos“ DNR patekimo, dalis. Ląstelės-šeimininko DNR yra apsaugoma nuo sukarpymo modifikuojuoju (metilinant) DNR seką, kurią atpažįsta endonukleazės. Dėl ypatingo specifiškumo šie restrikcijos fermentai rado platų pritaikymą genų inžinerijoje. Šiuo metu įvairiose bakterijose yra surasta ~3700 II tipo restrikcijos fermentų, atpažįstančių ~260 skirtingų nukleotidinių sekų (www.rebase.neb.com; 2006.09.08).

Atsižvelgiant į struktūrinę organizaciją ir veikimo pobūdį, II tipo restrikcijos endonukleazės yra suskirstytos į keletą potipių. IIP tipo restrikcijos fermentai dažniausiai yra homodimerai, gebantys sąveikauti tik su vienu atpažinimo taikiniu. Dimerinis fermentas prisiriša prie palindrominės atpažinimo sekos, o kiekvieno subvieneto aktyvus centras katalizuoja fosfodiesterinės jungties hidrolizę vienoje iš DNR grandinių. Dauguma IIF tipo restrikcijos fermentų yra homotetramerai, sudaryti iš dviejų pirminių dimerų (Deibert ir kiti, 2000; Grazulis ir kiti, 2002; Siksnys ir kiti, 1999; Vanamee ir kiti, 2005). Pirminis dimeras yra panašus į IIP tipo fermentą ir gali sąveikauti su viena DNR molekule. Tokiu būdu tetrameriniai fermentai vienu metu gali surišti dvi DNR molekules, turinčias atpažinimo seką ir perkirpti fosfodiesterinius ryšius abiejuose taikiniuose.

Restrikcijos endonukleazė Bse634I atpažįsta simetrinę „išsigimusią“ heksanukleotidinę seką $R\downarrow CCGGY$ ir kerpa abi jos DNR grandines po pirmo nukleotido (kirpimo vieta pažymėta „ \downarrow “)(Repin ir kiti, 1995). Bse634I yra tipinis IIF tipo restrikcijos fermentas. Pirma, rentgenostruktūrinė analizė parodė, kad Bse634I yra homotetrameras, sudarytas iš dviejų dimerų (Grazulis ir kiti, 2002). Antra, fermentas geba surišti ir perkirpti dvi atpažinimo sekas. Bse634I, kaip ir kiti IIF tipo fermentai, du taikinius turintį substratą perkerpa žymiai greičiau negu tik vieną atpažinimo seką turinčią DNR (Grazulis ir kiti, 2002). Bse634I priklauso didelei evoliuciškai susijusių II tipo restrikcijos fermentų šeimai, kurios atstovai atpažįsta panašias nukleotidines sekas ir kerpa DNR konservuotoje atpažinimo sekos vietoje (Bujnicki, 2004; Pingoud ir kiti, 2002; Tamulaitis ir kiti, 2002). Šios šeimos fermentai turi panašią tretinę monomero struktūrą (Bochtler ir kiti, 2006; Siksnys ir kiti, 2004; Zhou ir kiti, 2004); tačiau skirtingą ketvirtinę struktūrą. Bse634I, kartu su NgoMIV ir Cfr10I, yra homotetramerai (Siksnys ir kiti, 2004), kiti fermentai (PspGI, Ecl18kI, EcoRII) yra homodimerai (Pingoud ir kiti, 2003; Reuter ir kiti, 1998; Tamulaitis ir kiti, 2002), tuo tarpu SgrAI tirpale yra homodimeras, tačiau sąveikaudamas su DNR sudaro laikinus tetramerus (Daniels ir kiti, 2003). Homologinių restrikcijos fermentų oligomerinės struktūros ir funkcijos ryšio supratimas padėtų išsiaiškinti skirtingos ketvirtinės struktūros biologinę ir funkcinę svarbą.

Šio darbo pagrindiniai tikslai buvo:

1. Ištirti oligomerinės būsenos svarbą restrikcijos endonukleazės Bse634I funkcijai.
2. Identifikuoti tetramerinės restrikcijos endonukleazės Bse634I aktyvumo reguliacijos mechanizmus.

Darbo naujumas ir reikšmė. Pirmą kartą pademonstruota, kad Bse634I tetramerizacija yra reikalinga funkciškai svarbaus dimero stabilizacijai. Parodyta, kad viena mutacija tetramerinį IIF tipo restrikcijos fermentą gali paversti įprastine IIP tipo endonukleaze. Tai leidžia išvelgti galimą evoliucinį ryšį tarp dimerinių ir tetramerinių restrikcijos fermentų. Pirmą kartą pateikti

eksperimentiniai įrodymai ir pasiūlytas tetramerinių restrikcijos fermentų katalitinio aktyvumo reguliacijos mechanizmas.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Bse634I tetramerizacija yra būtina funkciškai svarbaus dimero stabilizacijai.
2. Komunikacinė sąveika tarp pirminių Bse634I dimerų sumažina fermento tetramero katalitinį aktyvumą, karpant vieną taikinį turinčią DNR.
3. Restrikcijos endonukleazės Bse634I ir mutantinių fermentų katalitinių ir reguliacijos savybių skirtumus nulemia du komunikacinės sąveikos tipai.
4. DNR segtukas yra alternatyvus substratas plazmidinei DNR, tiriant restrikcijos fermentus, sąveikaujančius su keliais atpažinimo taikiniais.

TYRIMŲ METODIKA

Fermentai. DNR polimerazės, T4 polinukleotidkinazė, terminalinė deoksinukleotidtransferazė, šarminė fosfatazė, T4 DNR ligazė ir visos darbe naudotos restrikcijos endonukleazės pagamintos UAB „Fermentas“. Termolizinas pagamintas firmoje „SERVA“. Visi šie produktai naudoti atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas.

Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant nedenatūruojančioms sąlygoms. Elektroforetinio buferio sudėtis: 40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant 25 °C), 5 mM kalcio acetato. Darbe naudoti 6 % akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 29:1) geliai. Radioaktyviais izotopais žymėti oligonukleotidai buvo sumaišomi su įvairiais baltymo kiekiais susirišimo buferyje (40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant 25 °C), 5 mM kalcio acetato, 10 % glicerolio ir 0.1 mg/ml jaučio serumo albumino), gauti mišiniai palaikomi kambario temperatūroje 10 min ir frakcionuojami gelyje 3-4 valandas esant kambario temperatūrai ir ~6 V/cm elektrinio lauko stiprumui. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinami, o radioaktyvi DNR detektuojama fosforescencinių ekranų („FujiFilm“) ir Cyclone™ skenerio („Packard Instruments“) pagalba.

Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms. Elektroforezės buferio sudėtis: 100 mM Tris-borato (pH 8.2 esant kambario temperatūrai) ir 2 mM EDTA. Gelių sudėtis: 20 % akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 29:1) ir 6-7 M karbamido elektroforezės buferyje. Prieš užnešant pavyzdžius, vykdyta 2 h peforezė (30 V/cm), užnešti pavyzdžiai frakcionuoti dar 2-3 h. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinami, o radioaktyvi DNR aptinkama kaip aprašyta aukščiau.

Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms. Elektroforezės buferio sudėtis: 25 mM Tris, 190 mM glicino (pH 8.3 esant kambario temperatūrai) ir 0.1 % natrio dodecilsulfato (NDS). Koncentruojančio ir frakcionuojančio gelių sudėtis: atitinkamai 4 % (125 mM Tris-HCl (pH 6.8 esant kambario temperatūrai) ir 0.1 % NDS) ir 12 % (375 mM Tris-HCl (pH 8.8 esant kambario temperatūrai) ir 0.1 % NDS) akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37.5:1). Baltymų mėginiai buvo sumaišomi 1:1 su mėginio buferiu (100 mM Tris-HCl (pH 6.8 esant kambario temperatūrai), 4 % NDS, 200 mM DTT, 20 % glicerolio), gauti mišiniai prieš elektroforezę palaikomi 3 min 95 °C vandens vonelėje. Pavyzdžiai buvo frakcionuojami 1-1.5 h esant kambario temperatūrai (30 V/cm). Geliai, nudažyti kumasi mėliu, buvo fotografuojami skaitmenine fotokamera („Biometra BioDocAnalyse“), o gauti vaizdai analizuojami programa 1D Main („Advanced American Biotechnology“).

Elektroforezė agaroziniuose geliuose esant nedenatūruojančioms sąlygoms. Įvairių plazmidinių substratų formų, susidarančių karpant superspiralizuotus plazmidinius substratus restrikcijos endonukleaze Bse634I bei jos mutantais, atskirymui naudoti 1 % agaroziniai geliai. Elektroforetinio buferio sudėtis: 100 mM natrio borato, 15 mM natrio acetato, 2 mM EDTA (pH 8.2 esant kambario temperatūrai) ir 0.5 µg/ml etidžio bromido. UV lempa apšviesti geliai buvo fotografuojami skaitmenine fotokamera, o gauti vaizdai analizuojami programa 1D Main („Advanced American Biotechnology“). DNR fragmentai, reikalingi genų inžinerijos procedūroms, buvo frakcionuojami 1 % agaroziniuose geliuose elektroforezės buferyje be etidžio bromido (40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant kambario temperatūrai) ir 1 mM EDTA).

Bse634I ekspresija. *E. coli* kamienas ER2267 ir plazmidė pBse634IR3.7 (Grazulis ir kiti, 2002) buvo naudoti laukinio tipo ir mutantinių Bse634I baltymų gavimui. Ekspresijos kamienas turėjo papildomą plazmidę pHpaIIM su metiltransferazės HpaII genu.

Mutagenėzė. Kryptinga Bse634I mutagenėzė buvo vykdyta dviejų stadijų PGR („megapradmens“) metodu (Barik, 1995). Mutacijų įvedimas tik konkrečioje vietoje buvo patvirtintas, nustatant viso geno nukleotidinę seką.

Baltymų gryninimas. Laukinio tipo ir mutantiniai Bse634I baltymai buvo išgryninti panaudojant skysčių chromatografiją, kaip aprašyta anksčiau (Grazulis ir kiti, 2002).

Gelfiltracija. Laukinio tipo ir W228A Bse634I gelfiltracijos eksperimentai buvo atlikti naudojant AKTA FPLC chromatografinę sistemą ir Superdex 200 HR kolonėlę („Amersham Biosciences“).

Eliucijos buferio sudėtis: 10 mM kalio fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl ir 0.02 % NaN₃. Baltymų pavyzdžiai (16 μM) buvo paruošti bendrame 500 μl eliucijos buferio tūryje. Baltymų molekulinės masės buvo paskaičiuotos naudojantis kalibracine kreive, sudaryta nustatčius žinomos molekulinės masės standartinių baltymų („Bio-Rad“) eliucijos tūrius.

Analitinis ultracentrifugavimas. Laukinio tipo ir mutantinių Bse634I baltymų molekulinės masės tirpale (nesant ir esant GdmCl) buvo nustatytos analitinio ultracentrifugavimo pagalba esant pusiausvyrinėms sedimentacijos sąlygoms (Zaremba ir kiti, 2005). Baltymų pavyzdžiai (6 μM) paruošti 10 mM kalio fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM 1,4-ditiotreitolio (DTT) buferyje. Eksperimentai atlikti esant 20 °C, tariamos molinės masės paskaičiuotos kaip aprašyta anksčiau (Siksnyš ir kiti, 1999; Zaremba ir kiti, 2004).

Baltymų denatūracija GdmCl. Laukinio tipo ir mutantinių Bse634I baltymų denatūracija GdmCl buvo tirta 10 mM kalio fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT buferyje. Baltymų denatūracijos eksperimentai buvo atlikti sumaišant baltymų tirpalus (galutinės baltymų koncentracijos atitinkamai 0.5-2 μM ir 6.4 μM fluorescencijos ir CD eksperimentuose) su įvairios koncentracijos GdmCl tirpalais. Pavyzdžiai buvo inkubuojami per naktį 25 °C temperatūroje, po to buvo pamatuoti jų fluorescencijos ir/arba CD signalai. Renatūracijos eksperimentuose iš anksto (1 h esant 25 °C) 6 M GdmCl tirpale denatūruoti Bse634I baltymų mėginiai buvo 15 kartų skiedžiami įvairios koncentracijos GdmCl tirpalais. Praskiesti pavyzdžiai palikti per naktį 25 °C temperatūroje, po to buvo pamatuoti jų fluorescencijos ir/arba CD signalai. Fluorescencijos ir CD matavimai buvo atlikti kaip aprašyta anksčiau (Zaremba ir kiti, 2004).

Negrižtama terminė inaktyvacija. Laukinio tipo ir W228A Bse634I baltymų pavyzdžiai (0.4 μM), paruošti denatūracijos eksperimentuose naudotame buferyje (žr. aukščiau), buvo užpilti mineralinės alyvos sluoksniu ir inkubuojami 70 °C temperatūroje. Tam tikrais laiko momentais pavyzdžiai buvo patalpinami į ledų vonią. Liekamasis fermentinis aktyvumas buvo įvertintas 25 °C temperatūroje naudojant vieną ir du taikinius turinčią plazmidinę DNR kaip substratą, esant tokioms eksperimentinėms sąlygoms, kuriomis fermentinis aktyvumas yra tiesiogiai proporcingas baltymo koncentracijai. Fermentinio aktyvumo nykimas 70 °C temperatūroje buvo aprašomas viena eksponente su tariama negrižtamos terminės inaktyvacijos greičio konstanta k_{obs} . Inaktyvacijos puslaikis buvo paskaičiuotas panaudojant išraišką $t_{1/2} = \ln(2)/k_{obs}$.

Dalinė proteolizė. Laukinio tipo ir mutantinių Bse634I baltymų proteolizė termolizinu buvo atliekama 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM kalcio acetato buferyje esant 25 °C temperatūrai. Proteolizė buvo stabdoma pridodant EDTA iki galutinės 10 mM koncentracijos ir pašildant mėginius 3 min 40 °C. Proteolizės mišinyje galutinė baltymų koncentracija buvo 5 μM; baltymo ir termolizino santykis 50:1 (pagal masę). Proteolitiniai baltymų fragmentai buvo frakcionuojami elektroforezės pagalba, termolizino nesukarpyto baltymo kiekis įvertintas densitometrinės analizės būdu, nuskanavus kumasi mėliu nudažytus gelius, kaip aprašyta aukščiau.

Oligonukleotidiniai substratai. Visi šiame darbe naudoti deoksioligonukleotidai buvo susintetinti „Metabion“. DNR dupleksai (Lentelė 1) buvo gaunami sulydant atitinkamus viengrandžius oligodeoksinukleotidus. Gaminant radioaktyviais izotopais žymėtus substratus, prieš sulydymą reikiama DNR grandinė buvo žymima 5'-gale ³³P izotopu panaudojant T4 polinukleotidkinazę ir [³³P]ATP arba 3'-gale ³²P izotopu panaudojant terminalinę transferazę ir [³²P]ddATP (žymėti nukleotidtrifosfatai pagaminti „Amersham Biosciences“).

Baltymo ir DNR sąveikos tyrimas. Šiuose eksperimentuose buvo naudoti ³³P izotopu pažymėti specifinis (30/30) ir nespecifinis (30/30NSP) 30 bp dupleksai (Lentelė 1). Įvairūs baltymų kiekiai buvo inkubuojami su DNR dupleksais (0.1 nM) susirišimo buferyje (40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant 25 °C), 5 mM kalcio acetato, 10 % glicerolio ir 0.1 mg/ml jaučio serumo albumino) kambario temperatūroje 10 min. Nustatant baltymo-DNR komplekso sudėtį, tetrameriniai baltymai (2 nM tetramero) buvo sumaišomi su pažymėtais specifiniais 30 bp arba 12 bp DNR dupleksais (atitinkamai 30/30 ir 12/12) arba jų mišiniu (dupleksų koncentracijų santykis varijuotas nuo 9:1 iki 1:9) esant fiksuotai bendrai DNR koncentracijai (4 nM). Dėl mažesnio dimerinių mutantų giminingumo specifiniam 12 bp dupleksui, analogiškuose eksperimentuose baltymo ir DNR koncentracijos

padidintos iki 500 nM. Laisva DNR ir baltymo-DNR kompleksai buvo frakcionuojami poliakrilamidiniame gelyje esant nedenaatūruojančioms sąlygoms, kaip aprašyta aukščiau.

1 lentelė. Šiame darbe naudoti oligonukleotidiniai substratai ir jų trumpi aprašymai.

Dupleksas	Seka	Aprašymas
30/30 Bio-30/30	5' -AGACCCACGCTCACCGGTTCCAGATTTATC-3' 3' -TCTGGGTGCGAGTGGCCAAGGTCTAAATAG-5'	30 bazių porų (bp) specifinis Bse634I substratas (atpažinimo seka pabraukta). Bio-30/30 viršutinė DNR grandinė 5'-gale turi biotino grupę.
Bio-30-30	5' -AGACCCACGCTCACCGGTGAGAGATTACGT\ 3' -TCTGGGTGCGAGTGGCCACTCTCTAATGAT/	30 bp specifinis DNR segtukas (Bse634I atpažinimo seka pabraukta). DNR segtukas 5'-gale turi biotino grupę.
30m/30m	5' -AGACCCACGCTCA _{m5} C _{CG} -GTTCCAGATTTATC-3' 3' -TCTGGGTGCGAGT-GGC _{m5} CAAGGTCTAAATAG-5'	30 bp specifinis DNR dupleksas, turintis metilo grupes Bse634I atpažinimo sekoje (m5C bazės paryškintos).
30m'/30m'	5' -AGACCCACGCTCAC _{m5} C-GTTCCAGATTTATC-3' 3' -TCTGGGTGCGAGTG-G _{m5} CCAAGGTCTAAATAG-5'	Toks pat kaip 30m/30m, tik metilo grupes turi atpažinimo sekos vidinės C bazės.
12/12	5' -CTCACCGGTTCC-3' 3' -GAGTGGCCAAGG-5'	12 bp specifinis Bse634I substratas, (atpažinimo seka pabraukta).
13/17P	5' -AGACCCACGCTCA-3' 3' -TCTGGGTGCGAGTGGCC _P -5'	Dupleksas, atitinkantis specifinio 30/30 substrato karpymo produktą.
13/17	5' -AGACCCACGCTCA-3' 3' -TCTGGGTGCGAGTGGCC _{OH} -5'	Toks pat kaip 13/17P, tačiau jo apatinė grandinė 5'-gale neturi fosfato.
AA/TT	5' -ACGCTCACCGGATCCAGA-3' 3' -TGCGAGTGGCCTAGGTCT-5'	18 bp dupleksas, turintis nekanoninį Bse634I taikinį ACCGGA (pabrauktas).
TA/TA	5' -TAGTCCGGACTA-3' 3' -ATCAGGCCTGAT-5'	18 bp dupleksas, turintis nekanoninį Bse634I taikinį TCCGGA (pabrauktas).
30/30NSP	5' -AGCGTAGCACTGGGCTGCTGAACTGTGCTG-3' 3' -TCGCATCGTGACCCGACGACTTGACACGAC-5'	Nespecifinis 30 bp dupleksas, neturintis Bse634I atpažinimo sekos.

Specifinio DNR segtuko hidrolizė. Eksperimentai su specifiniu DNR segtuku tirpale buvo atliekami reakcijos buferyje (10 mM Tris-HCl (pH 8.6 esant 25 °C), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂ ir 0.1 mg/ml jaučio serumo albumino) esant 25 °C temperatūrai. Naudota 20 nM DNR substrato koncentracija ir įvairios Bse634I (5-4000 nM) koncentracijos. Reakcijos stabdytos ekstrakcija pH 8.0 buferiu prisotintu fenolio/chloroformo mišiniu. Gauti pavyzdžiai buvo frakcionuojami poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms.

Imobilizuotų oligonukleotidų hidrolizė. Biotinilinti oligonukleotidai buvo imobilizuojami ant streptavidinu dengtų magnetinių dalelių („Promega“), koncentracija 1 mg/ml, talpa 1 nmol biotino / 1 mg dalelių). Imobilizacijai naudotos tokios sąlygos, kad biotinilinta DNR užimtų ne daugiau kaip 1 % galimų surišimo vietų (Sasnauskas ir kiti, 2003). Imobilizuotų DNR substratų hidrolizė tirta kaip aprašyta aukščiau, tik šiuo atveju DNR substratas būdavo ne tirpale, o ant suspenduotų dalelių paviršiaus. Imobilizuoto bio-30/30 duplekso hidrolizės stimuliacijos eksperimentuose apibrėžti nebiotinilintų 30/30, AA/TT, TA/TA, 30/30NSP, 30m/30m, 30m'/30m', 13/17 ar 13/17P dupleksų kiekiai buvo pridedami į reakcijos mišinį (Lentelė 1).

Plazmidinių substratų hidrolizė. Eksperimentų sąlygos: 2.3 nM plazmidinės DNR ir 8-8000 nM Bse634I reakcijos buferyje, naudotame eksperimentuose su oligonukleotidiniais substratais, esant 25 °C. Reakcijos stabdytos fenolio/chloroformo mišiniu. Susidariusios įvairios plazmidinės DNR

formos buvo atskiriamos elektroforezės agaroziniuose geliuose pagalba ir detektuojamos kaip aprašyta aukščiau.

Duomenų apdorojimas. Kiekybinis kinetinių duomenų aprašymas viena eksponente ar nuoseklios reakcijos schemomis (1) ir (2) atliktas naudojant programą KyPlot 2.0 (Yoshioka, 2002). Reakcijos greičio konstantų k_1 ir k_2 optimalios reikšmės apskaičiuotos DNR segtuko ir vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizės duomenis aprašant lygtimis:

$$p(SS) = \exp(-k_1 t);$$

$$p(SP) = \{[k_1/(k_1-k_2)] \times [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)]\};$$

$$p(PP) = 1 - p(SS) - p(SP),$$

kur $p(SS)$ yra reakcijos substrato (DNR segtuko arba plazmidinės DNR SS formos) dalis, $p(SP)$ yra viengrandį turinčios DNR segtuko SP arba plazmidinės DNR VT formos dalis, o $p(PP)$ – dvigrandį trūkį turinčios DNR segtuko PP arba plazmidinės DNR L formos dalis.

Du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizės aprašymui, kai taikiniai yra karpomi nepriklausomai, naudota modifikuota nuoseklios reakcijos lygtis (1), o $p(SS)$, $p(SP)$ ir $p(PP)$ reikšmės reakcijos metu paskaičiuotos naudojant lygtis:

$$p(SS^*) = p(SS)^2;$$

$$p(VT) = 2p(SS) \times p(PS) + p(PS)^2;$$

$$p(L) = 2p(PP) \times p(PS) + 2p(PP) \times p(SS);$$

$$p(L1+L2) = p(PP)^2,$$

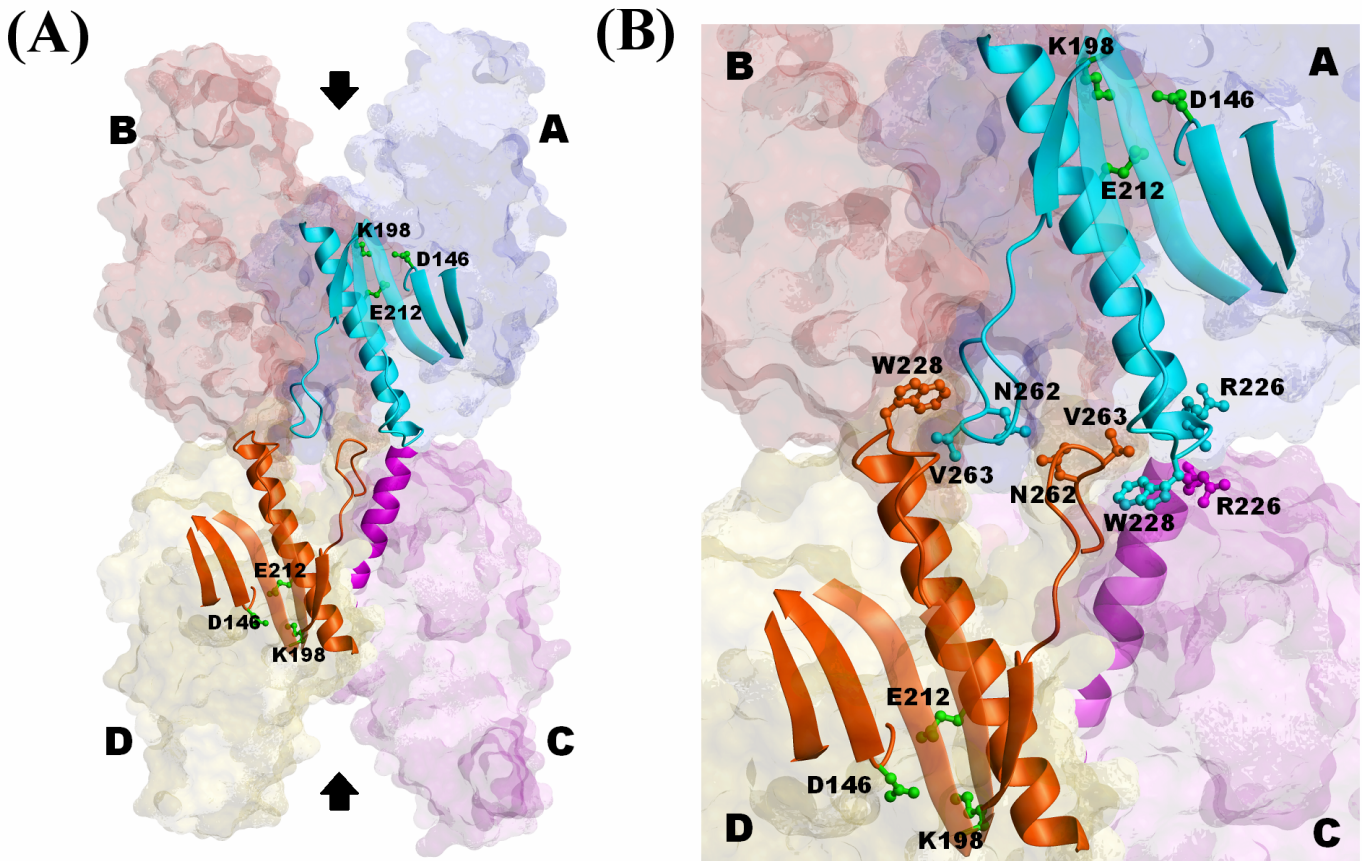
($p(SS^*)$ yra superspiralizuotos plazmidinės DNR formos dalis).

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1. Tetramerinės restrikcijos endonukleazės Bse634I pavertimas dimerine

Restrikcijos endonukleazė Bse634I buvo rasta termofiliniame mikroorganizme *Bacillus stearothermophilus*, kurio optimali augimo temperatūra yra 60°C (Repin ir kiti, 1995). Šis II tipo restrikcijos fermentas atpažįsta simetrinę „išsigimusią“ heksanukleotidinę seką R↓CCGGY ir kerpa abi jos DNR grandines po pirmo nukleotido (kirpimo vieta pažymėta rodykle), susidarant 4 nt ilgio 5'-išlindusiems galams. Bse634I yra homotetrameras, kurio optimalus katalitinis aktyvumas pasireiškia sąveikaujant su dviem savo atpažinimo sekomis (Grazulis ir kiti, 2002). Be to, du surištus DNR taikinius Bse634I perkerpa sutartinai. Dėl šių savybių Bse634I priskirtas restrikcijos endonukleazių IIF tipui (Roberts ir kiti, 2003).

Bse634I tetrameras yra sudarytas iš dviejų sukibusių pirminių dimerų, kurių kiekvienas gali surišti po vieną DNR molekulę (1 pav. (A)) (Grazulis ir kiti, 2002). Pirminis Bse634I dimeras yra labai panašus į įprastą IIP tipo restrikcijos endonukleazę. Pagrindinis šios studijos tikslas buvo nustatyti tetramerizacijos svarbą Bse634I funkcijai. Pradžioje mes pabandėme šį tetramerinį fermentą paversti dimeriniu, kryptingos mutagenezės pagalba pakeisdami tetramerizacijoje dalyvaujančias aminorūgštis.



1 pav. Restrikcijos endonukleazės Bse634I struktūra (PDB ID 1KNV (Grazulis ir kiti, 2002)) ir tetramerizacijos paviršius. (A) Bse634I tetramero paviršius. Monomerai nuspalvinti raudona, mėlyna, auksine ir violetine spalvomis ir pažymėti A, B, C, D raidėmis. Išskirti struktūriniai A, C ir D subvienetų elementai, kurių regionai dalyvauja pirminių dimerų (A-B ir C-D) tarpusavio sąveikoje. Be to, išskirti A ir D subvienetų centrinius β-lakštus, kuriuose išsidėsčiusios aktyvaus centro aminorūgštys (nuspalvintos žaliai ir pažymėtos). Du DNR surišimo plyšiais nurodyti rodyklėmis. (B) Padidintas Bse634I tetramerizacijos paviršiaus vaizdas. Greta A ir D subvienetų aktyvaus centro aminorūgščių pažymėtos ir tetramerizacijoje dalyvaujančios liekanos, kurios kryptingos mutagenezės būdu buvo pakeistos kitomis.

1.1. Dimerinės Bse634I formos konstravimas

Bse634I tetramerizacijos paviršiaus analizė parodė, kad triptofanas 228 sudaro didžiąją dalį kontaktų tarp pirminių dimerų (1 pav. (B)). Kiekvieno monomero triptofanas 228 yra išsidėstęs hidrofobinėje kišenėje, sudarytoje iš kaimyninio pirminio dimero aminorūgščių liekanų. Todėl siekiant gauti dimerinę Bse634I formą, kryptingos mutagenezės būdu triptofanas W228 buvo pakeistas alaninu, tikintis, kad įvesta mutacija sąlygos tetramero suirimą iki pirminių dimerų. W228A mutantinis baltymas ekspresuotas *E. coli* ląstelėse, išgrynintas ir ištirtos jo oligomerinė būseną bei funkcinės savybės.

1.2. Oligomerinės būsenos tyrimas gelfiltracijos ir analitinio ultracentrifūgavimo metodais

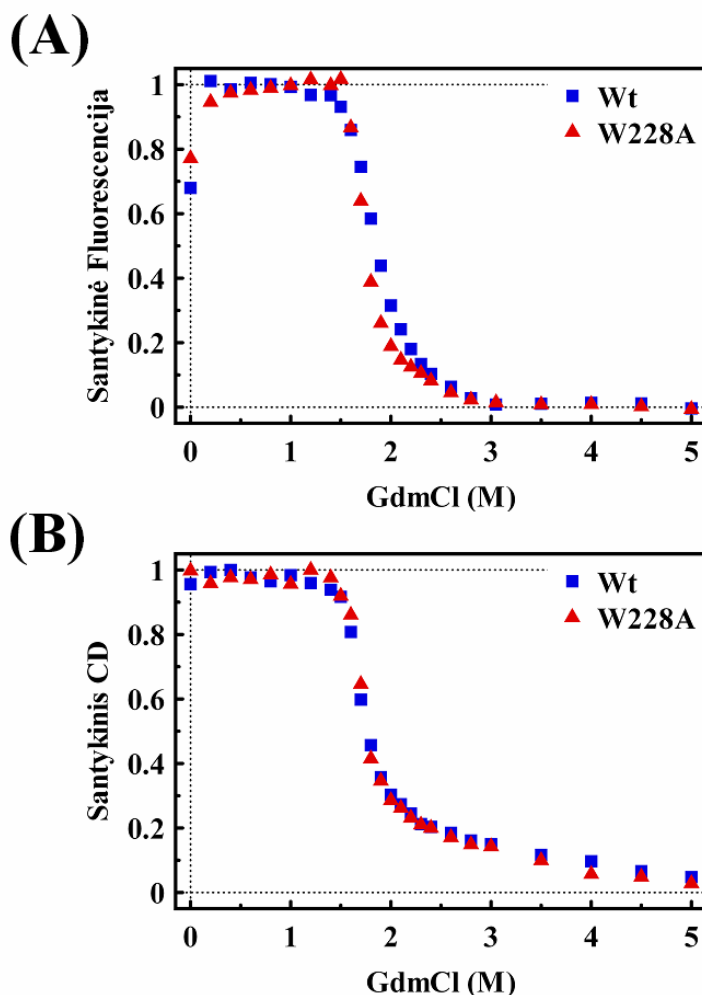
Pradžioje gelfiltracijos metodu ištyrėme laukinio tipo (wt) Bse634I ir W228A mutantinio baltymo oligomerinę būseną tirpale. Nustatyta wt Bse634I molekulinė masė (142 kDa) yra artima paskaičiuotai tetramero molekulinės masės reikšmei (135 kDa). Tuo tarpu W228A baltymo nustatyta molekulinės masės reikšmė (50 kDa) žymiai skiriasi nuo teorinės dimero molekulinės masės reikšmės (67 kDa). Toks nustatytos ir paskaičiuotos molekulinės masės reikšmių skirtumas galėtų atsirasti dėl galimos baltymo sąveikos su gelfiltracijos kolonėlės stacionaria faze ir/arba dėl baltymo molekulės formos. Siekiant išvengti galimos šių veiksmų įtakos, abiejų baltymų molekulinės masės buvo nustatytos analitinio ultracentrifūgavimo metodu pusiausvyrinės sedimentacijos sąlygomis. Gautos laukinio fermento ir W228A mutantinio baltymo molekulinės masės atitinkamai yra 125 kDa ir 55 kDa. Šie rezultatai patvirtino, kad wt Bse634I tirpale egzistuoja tetramerinėje būsenoje. Tuo tarpu nustatyta W228A molekulinė masė yra beveik 20 % mažesnė už teorinę dimero masę. Tokių molekulių masių reikšmių skirtumą galima būtų paaiškinti daline W228A dimero disociacija į monomeras. Iš tikrųjų, cheminės denatūracijos tyrimai rodo, kad net esant mažoms denatūrantų guanidino monochlorido koncentracijoms stebima ženkliai W228A disociacija į monomeras (žr. 3 pav.).

1.3. Oligomerinės būsenos ir stabilumo priklausomybės tyrimas

Gelfiltracijos ir sedimentacijos eksperimentai parodė, kad Bse634I tetramerizacijos paviršiuje triptofano 228 pakeitimas alaninu sąlygoja tetramero suirimą į dimerus. Siekdami nustatyti oligomerinės būsenos svarbą baltymo stabilumui, mes ištyrėme wt Bse634I ir W228A mutanto denatūraciją cheminiais reagentais, terminę inaktyvaciją ir atsparumą proteolitinei degradacijai.

1.3.1. Cheminė denatūracija

Wt Bse634I ir W228A mutanto denatūracija GdmCl stebėta matuojant baltymo triptofanų fluorescencijos ir cirkuliarinio dichrozmo (CD) signalų pokyčius esant įvairioms denatūrantų koncentracijoms. Fluorescencijos eksperimentų metu baltymas sužadinamas 295 nm bangos ilgio šviesa, o fluorescencijos emisija matuojama esant 330 nm bangos ilgiui, nes vykstant Bse634I baltymo denatūracijai, šiame bangos ilgyje yra stebimas didžiausias fluorescencijos emisijos signalo pokytis. Denatūrantų GdmCl įtaka baltymo antrinei struktūrai įvertinta matuojant CD signalo pokytį 222 nm bangos ilgyje. Reiktų pastebėti, kad wt Bse634I ir W228A mutanto CD spektrai yra identiški (duomenys nepateikti). Tai rodo, kad W228A mutacija nesukėlė didelių baltymo konformacijos pokyčių.

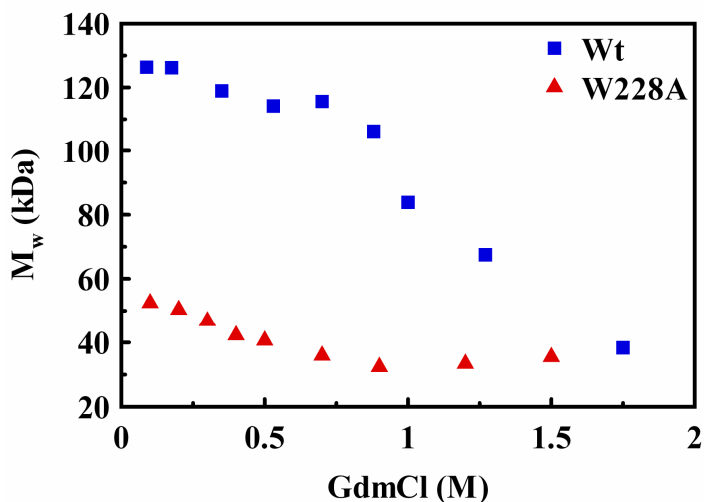


2 pav. Wt Bse634I ir W228A mutanto denatūracija GdmCl (Zaremba ir kiti, 2005). Denatūracija buvo stebėta registruojant (A) fluorescencijos emisijos signalą esant 330 nm bangos ilgiui ir (B) CD signalą esant 222 nm bangos ilgiui. Baltymų koncentracijos buvo 0.5 μ M fluorescencijos ir 6.4 μ M CD matavimuose. Wt Bse634I (■) ir W228A mutanto (▲) baltymų pavyzdžiai buvo inkubuojami per naktį 25 °C temperatūroje tirpale esant įvairioms GdmCl koncentracijoms, po to pamatuojami jų fluorescencijos ir CD signalai. Grafikuose atidėtos normalizuotos fluorescencijos ir CD signalų reikšmės.

Wt Bse634I ir W228A mutanto normalizuotų fluorescencijos ir CD signalų pokyčiai, didinant GdmCl koncentraciją, pavaizduoti, atitinkamai, 2 pav. (A) ir (B). Didžiausi tiek fluorescencijos, tiek CD signalų pokyčiai įvyksta tame pačiame GdmCl koncentracijų intervale. Abiejų baltymų atvejais stebimos vienpakopės denatūracijos kreivės sutampa. Denatūracijos kreivių vidurio taškas (denatūracijos koncentracija, kurioje pusė baltymo molekulių yra denatūravusios) yra ~1.8 M GdmCl (2 pav.). Laukinio tipo ir mutantinio baltymų denatūracija GdmCl yra pilnai grįžtama. Absoliučios fluorescencijos ir CD signalų reikšmės įgyja pradinės vertes, kai iš anksto 6 M GdmCl denatūruoti baltymai renatūruojami pavyzdžius praskiedžiant 15 kartų buferiu be denatūracijos (duomenys nepateikti). Be to, renatūruoti baltymai turi analogiškas katalitines savybes kaip ir natyvūs baltymai (duomenys nepateikti).

Oligomerinių baltymų denatūracijos keliai gali būti žymiai sudėtingesni negu baltymų, sudarytų tik iš vienos polipeptidinės grandinės. Prieš polipeptidinės grandinės išsivyniojimą oligomerinis baltymas gali pradžioje disocijuoti į monomerus (Miller ir Schildbach, 2003) arba jo išsivyniojimas ir disociacija gali vykti tuo pačiu metu (Barry ir Matthews, 1999). Antruoju atveju denatūracijos kreivės vidurio taško reikšmė turėtų priklausyti nuo baltymo koncentracijos. Fluorescencijos eksperimentų duomenys rodo, kad, keičiant wt Bse634I ir

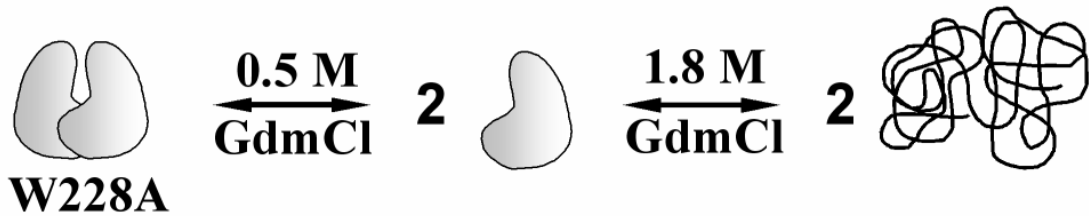
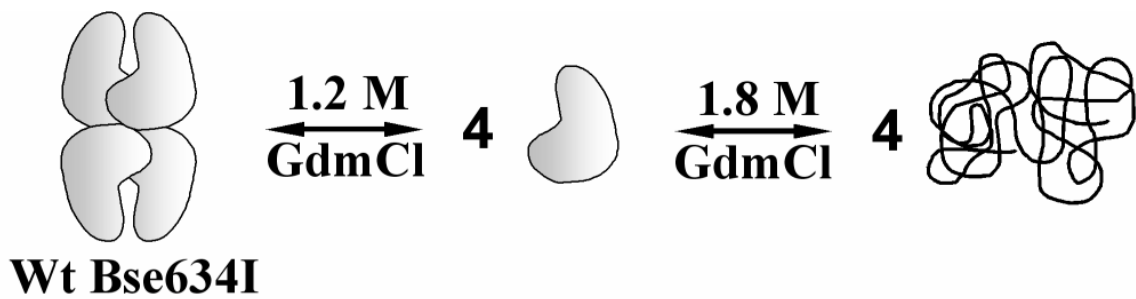
W228A mutanto baltymų koncentracijas nuo 0.5 μM iki 2 μM , denatūracijos kreivės nesikeičia (duomenys nepateikti). Be to, CD eksperimentuose naudota baltymų koncentracija buvo 13 kartų didesnė negu fluorescencijos eksperimentuose, tačiau denatūracijos kreivės vidurio taško reikšmės abiejose eksperimentuose sutapo (2 pav.). Taigi, wt Bse634I ir W228A baltymų disociacija greičiausiai nevyksta GdmCl koncentracijų intervale, kuriame stebimas baltymo polipeptidinės grandinės išsivyniojimas.



3 pav. Wt Bse634I ir W228A mutanto molekulinės masės esant įvairioms GdmCl koncentracijoms (Zaremba ir kiti, 2005). Wt Bse634I (■) ir W228A mutanto (▲) molekulinės masės nustatytos analitiniu ultracentrifūgavimo metodu, esant pusiausvyrinėms sedimentacijos sąlygoms (žr. „Tyrimų metodiką“).

Fluorescencijos ir CD signalų pokyčiai, stebimi denatūruojant wt Bse634I ir W228A mutantą GdmCl, atspindi denatūracijos metu vykstančius antrinės ir/arba tretinės baltymo struktūros pokyčius, tačiau nesuteikia informacijos apie baltymo oligomerinę būseną. Norint nustatyti wt Bse634I ir W228A mutanto oligomerinę būseną tirpale esant įvairioms GdmCl koncentracijoms, buvo panaudotas analitinio ultracentrifūgavimo metodas (3 pav.) Tirpale nesant GdmCl, wt Bse634I yra tetrameras, o W228A mutantas – dimeras. Didinant GdmCl koncentraciją nuo 0 iki 1 M, wt Bse634I išlieka tetramerinėje būsenoje. Tačiau toliau didinant denatūracijos koncentraciją, baltymo molekulinės masės reikšmė staigiai sumažėja ir, esant 1.8 M GdmCl, tampa artima monomero molekulinės masės reikšmei. Tuo tarpu dimerinio W228A mutanto disociacija į monomerus įvyksta esant žymiai mažesnėms GdmCl koncentracijoms negu laukinio tipo fermento atveju.

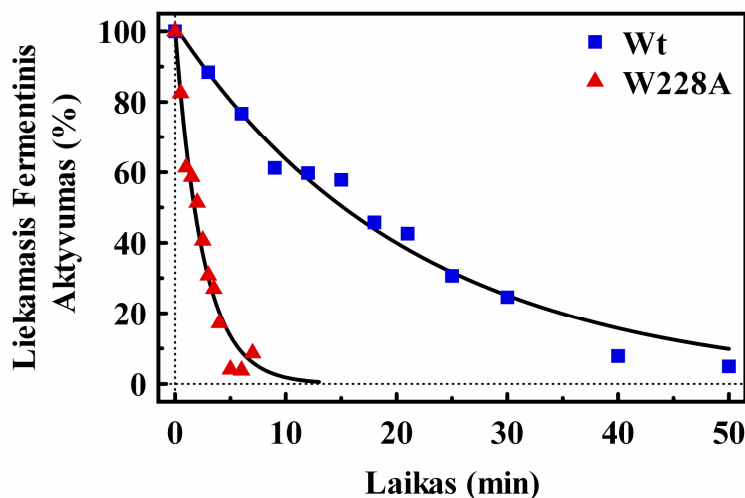
Taigi, analitinio ultracentrifūgavimo duomenys parodė, kad tiek wt Bse634I, tiek W228A mutantas prieš polipeptidinės grandinės išsivyniojimą disocijuoja į monomerus (4 pav.). Taigi, fluorescencijos ir CD signalų pokyčiai, esant didesnėms GdmCl koncentracijoms (2 pav.), atspindi monomero polipeptidinės grandinės išsivyniojimą. Laukinio tipo fermento ir W228A mutanto denatūracijos kreivių, gautų stebint denatūraciją spektroskopiniais metodais, sutapimas rodo, kad W228A mutacija neturėjo įtakos monomero stabilumui. Reikia pažymėti, kad W228A mutanto dimeras yra mažiau stabilus negu wt Bse634I tetrameras. Iš tikrųjų, W228A mutantas yra pilnai disocijavęs į monomerus net esant mažai (~0.5 M) GdmCl koncentracijai, kai tuo tarpu laukinio tipo fermentas išlieka tetramerinėje būsenoje GdmCl koncentraciją padidinus iki 1.0 M.



4 pav. *Wt Bse634I* ir *W228A* mutanto denatūracijos *GdmCl* schema (Zaremba ir kiti, 2005). Tiek *wt Bse634I*, tiek *W228A* mutantas prieš polipeptidinės grandinės išsivyniojimą disocijuoja į monomerus. *W228A* dimero disociacija įvyksta esant mažesnei *GdmCl* koncentracijai (~0.5 M) negu laukinio tipo baltymo tetramero atveju (~1.2 M). *Wt Bse634I* ir *W228A* mutanto polipeptidinės grandinės išsivyniojimas įvyksta esant tai pačiai *GdmCl* koncentracijai (~1.8 M).

1.3.2. Negrįžtama terminė inaktyvacija

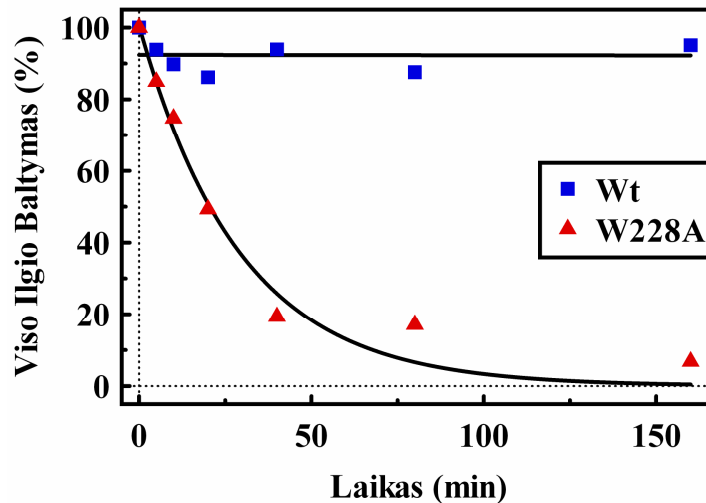
Wt Bse634I ir *W228A* mutanto baltymų stabilumai taip pat buvo palyginti, stebint jų negrįžtamą terminę inaktyvaciją. Baltymų pavyzdžiai buvo inkubuojami 70 °C temperatūroje skirtingą laiką ir nustatomas liekamasis fermentinis aktyvumas 25 °C temperatūroje. Laukinio tipo fermento inaktyvacijos puslaikis yra 15 min, tuo tarpu *W228A* mutanto – tik 1.7 min (5 pav.). Taigi, *W228A* mutanto atsparumas temperatūrai yra žymiai (apie 10 kartų) mažesnis negu laukinio tipo baltymo. Tokį stebimą terminio stabilumo skirtumą tarp laukinio tipo ir mutantinio baltymų galbūt galėtų nulemti jų skirtinga oligomerinė būsena tirpale.



5 pav. *Wt Bse634I* (■) ir *W228A* mutanto (▲) negrįžtama terminė inaktyvacija 70 °C temperatūroje (Zaremba ir kiti, 2005). Baltymų pavyzdžiai (0.4 μM) inkubuoti 70 °C temperatūroje ir po įvairių inkubacijos laikų nustatomas liekamasis fermentinis aktyvumas 25 °C temperatūroje.

1.3.3. Dalinė proteolizė

Baltymo atsparumas proteolitinei degradacijai dažnai koreliuoja su jo stabilumu (Kawamura ir kiti, 1998). Mes ištyrėme wt Bse634I ir W228A mutanto proteolizę termolizinu 25 °C temperatūroje (6 pav.). Laukinis fermentas yra atsparus termolizino poveikiui. Tuo tarpu pusę W228A mutantinio baltymo kiekio termolizinas hidrolizuoja per 20 min. Taigi, laukinio tipo baltymas yra žymiai atsparesnis proteolitinei degradacijai negu W228A mutantas.



6 pav. Wt Bse634I (■) ir W228A mutanto (▲) proteolitinė degradacija termolizinu (Zaremba ir kiti, 2005). Baltymų pavyzdžiai (5 μM) inkubuoti su termolizinu (baltymo ir termolizino santykis pagal masę 50:1) 25 °C temperatūroje. Įvairiais laiko momentais proteolizės reakcija buvo sustabdoma ir pavyzdžiai analizuojami kaip aprašyta “Tyrimų metodikoje”.

Stabilumo tyrimai parodė, kad W228A mutacijos pagalba suardžius Bse634I tetramerą, ženkliai sumažėja pirminio dimero atsparumas cheminiams denatūrantams, termininei inaktyvacijai ir proteolitinei degradacijai. Tačiau W228A mutacija nepakeičia baltymo antrinės struktūros ir neturi įtakos monomero stabilumui. Bse634I struktūros analizė rodo, kad triptofanas 228 tiesiogiai nedalyvauja pirminio dimero sudaryme, todėl mutacijos sąlygotą destabilizaciją galima būtų paaiškinti tik tetramerizacijos paviršiaus suardymu. Tokiu būdu tetramerizacija galėtų būti svarbi funkcinio Bse634I dimero stabilizacijai. Kaip jau buvo minėta, restrikcijos endonukleazė Bse634I buvo surasta termofiliniame mikroorganizme *Bacillus stearothermophilus*, kurio optimali augimo temperatūra yra 60 °C (Repin ir kiti, 1995). Eksperimentiškai parodyta, kad dimerinio W228A mutanto terminis stabilumas yra ženkliai sumažėjęs lyginant su wt Bse634I tetrameru. Toks dimerinis mutantas šeimininko ląstelėje, esant aukštomis temperatūroms, turėtų greitai prarasti savo katalitinį aktyvumą. Tikėtina, kad evoliucijos eigoje *Bacillus stearothermophilus* mikroorganizme buvo atrinktas Bse634I tetrameras, kadangi tetramerizacija papildomai stabilizavo funkciškai svarbų dimerą. Literatūroje yra gausu duomenų, rodančių, kad dažnai termofilinių fermentų aukštesnio laipsnio oligomerinė būseną sąlygoja didesnę jų stabilumą (Vieille ir Zeikus, 2001).

Aukščiau išdėstyta termostabilizacijos hipotezė, atrodytų, nelabai tiktų kitų tetramerinių restrikcijos endonukleazių atveju. Pavyzdžiui, SfiI fermentas, kaip ir Bse634I, yra stabilus tetrameras, tačiau jo šeimininkas *Streptomyces fimbriatus* optimaliai auga esant 26 °C temperatūrai (Qiang ir Schildkraut, 1984). Kitos dvi biochemiškai ir struktūriškai charakterizuotos homotetramerinės restrikcijos endonukleazės Cfr10I ir NgoMIV taip pat pasižymi padidintu termostabilumu (R. Skirgaila ir V. Šikšnys, neskelbti duomenys), nors jų

šeimininkai *Citrobacterium freundii* ir *Neisseria gonorrhoeae* yra mezofiliniai mikroorganizmai. Tačiau mes negalime atmesti galimybės, kad tetrameriniai restrikcijos fermentai galėjo atsirasti termofiliniuose mikroorganizmuose, kuriuose fermentų tetramerinė būseną buvo svarbi jų stabilumui, o vėliau šie fermentai galėjo patekti į mezofilinius mikroorganizmus. Tokią horizontalaus genų perdavimo hipotezę paremia ir kitų termostabilių restrikcijos fermentų, aptiktų mezofiliniuose mikroorganizmuose, pavyzdžiai (Piechula ir kiti, 2001). Kita vertus, restrikcijos endonukleazė PspGI iš hipertermofilinio mikroorganizmo *Pyrococcus species* yra labai termostabilus, tačiau dimerinis fermentas (Morgan ir kiti, 1998; Pingoud ir kiti, 2003). Taigi, skirtingi restrikcijos fermentai iš skirtingų mikroorganizmų baltymo stabilizacijai gali naudoti skirtingas strategijas. Bse634I atveju, tetramerizacija neabejotinai dalyvauja funkciškai svarbaus dimero stabilizavime. Kitame darbo etape mes ištyrėme skirtingų Bse634I oligomerinių formų funkcines savybes.

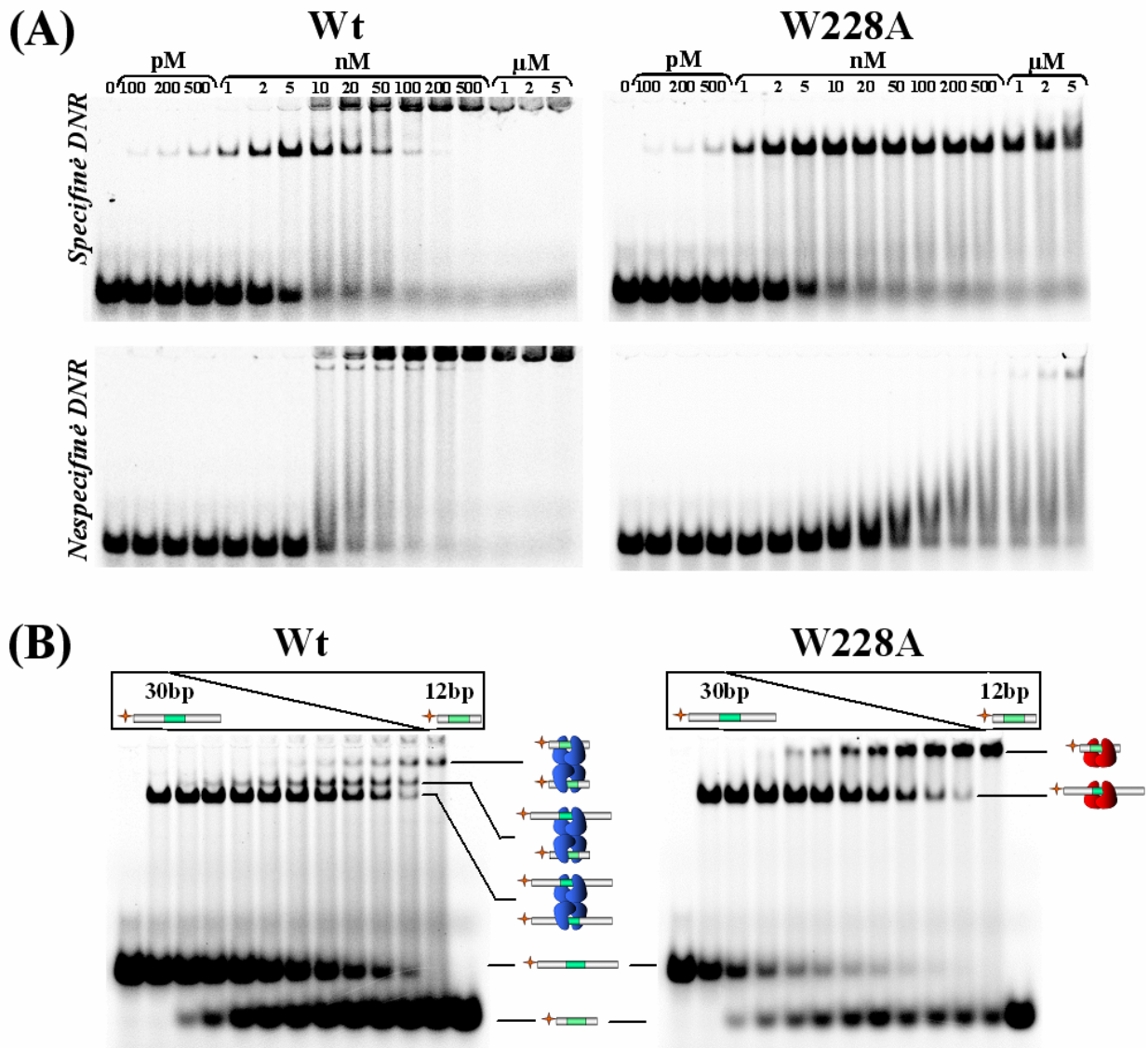
1.4. Wt Bse634I ir W228A mutanto sąveikos su DNR tyrimas

Bse634I tetrameras yra sudarytas iš dviejų pirminių dimerų, kurių kiekvienas turi atskirą sąveikos su DNR plyšį (1 pav. (A)). Tokiu būdu, tetrameras galėtų sąveikauti su dviem savo atpažinimo sekomis tuo pačiu metu. Tuo tarpu dimerinis W228A mutantas turėtų surišti tik vieną atpažinimo seką, jei sąveikos su DNR metu nevyksta jo tetramerizacija, kaip aprašyta restrikcijos fermento SgrAI atveju (Daniels ir kiti, 2003).

Pradžioje mes ištyrėme wt Bse634I ir W228A mutanto gebėjimą sąveikauti su DNR elektroforetinio judrumo poslinkio metodu, panaudodami radioaktyviu izotopu pažymėtus 30 bp ilgio specifinį ir nespecifinį oligonukleotidų dupleksus 30/30 ir 30/30NSP (žr. 1 lentelę). Šie eksperimentai atlikti tirpale esant Ca^{2+} jonams, kurie yra reikalingi restrikcijos endonukleazės Bse634I specifinei sąveikai su DNR, tačiau nesąlygoja DNR karpymo. Tiek wt Bse634I, tiek W228A mutantas žymiai stipriau sąveikauja su specifine DNR, turinčia Bse634I atpažinimo seką, negu su nespecifine DNR (7 pav. (A)).

Specifinės DNR atveju, esant mažoms baltymo koncentracijoms, Bse634I sudaro vieną baltymo-DNR kompleksą. Didinant baltymo koncentraciją, šis kompleksas pavirsta į kitą, mažesnę elektroforetinį judrumą turintį baltymo-DNR kompleksą. Nespecifinės DNR atveju yra stebimas tik mažesnę elektroforetinį judrumą turintis kompleksas, todėl antrasis kompleksas, stebimas eksperimente su specifine DNR esant didelėms baltymo koncentracijoms, turėtų būti nespecifinis baltymo-DNR kompleksas. Tuo tarpu W228A mutantas su specifine DNR sudaro tik vieną kompleksą (7 pav. (A)). Nespecifinės DNR atveju, esant didžiausioms naudotoms W228A baltymo koncentracijoms, yra stebima tik neapibrėžto elektroforetinio judrumo dėmė.

Specifiniai wt Bse634I-DNR ir W228A-DNR kompleksai, stebimi esant mažoms baltymo koncentracijoms, gali skirtis savo sudėtimi. Specifiniame baltymo-DNR komplekse Bse634I tetrameras gali būti surišęs vieną arba dvi DNR molekules. Dimerinis W228A mutantas turėtų surišti tik vieną DNR molekulę, jei sąveikos su DNR metu neįvyksta jo tetramerizacija, kaip pastebėta dimerinės restrikcijos endonukleazės SgrAI atveju (Daniels ir kiti, 2003).



7 pav. Wt Bse634I ir W228A mutanto sąveikos su DNR tyrimas (Zaremba ir kiti, 2005). (A) Baltymo ir DNR sąveikos tyrimas elektroforetinio judrumo poslinkio metodu. 0.1 nM ^{33}P izotopu žymėtos specifinės arba nespecifinės DNR (dupleksai 30/30 ir 30/30NSP, žr. 1 lentelę) buvo sumaišyti su įvairiais wt Bse634I ir W228A mutanto kiekiais (nurodyti virš elektroforegramų) ir po 10 min frakcionuoti poliakrilamidiniame gelyje. (B) Specifinių wt Bse634I ir W228A kompleksų su DNR sudėties tyrimas. Wt Bse634I (2 nM tetramero) arba W228A mutantas (500 nM dimero) buvo sumaišomi su ^{33}P izotopu pažymėtais specifiniais 30 bp ir 12 bp ilgio DNR dupleksais (žr. 1 lentelę) arba jų mišiniu (dupleksų koncentracijų santykis varijuotas nuo 9:1 iki 1:9) esant fiksuotai DNR koncentracijai (atitinkamai 4 nM ir 500 nM wt Bse634I ir W228A mutanto atvejais). Kraštiniuose takeliuose baltymo neįdėta. Paveikslėliai, esantys dešinėje elektroforegramų pusėje, vaizduoja skirtingus baltymo-DNR kompleksus.

Siekiant nustatyti wt Bse634I ir W228A mutanto kompleksų su specifine DNR sudėtimi buvo atlikti baltymo ir DNR sąveikos eksperimentai, kuriuose naudoti du skirtingo ilgio specifiniai oligonukleotidų dupleksai. Wt Bse634I ir W228A mutantas buvo sumaišomi su radioaktyviu izotopu pažymėtais specifiniais 30 bp ir 12 bp ilgio DNR dupleksais (žr. 1 lentelę) arba jų mišiniu (dupleksų koncentracijų santykis keitėsi nuo 9:1 iki 1:9) esant fiksuotai bendrai DNR koncentracijai. Naudotas baltymo monomero ir DNR koncentracijų santykis buvo 2:1, kad būtų išvengta mažesnį elektroforetinį judrumą turinčio komplekso susidarymo, matomo 7 pav. (A). Laukinio tipo Bse634I su skirtingo ilgio DNR dupleksų mišiniu sudaro tris skirtingus baltymo-DNR kompleksus (7 pav. (B)). Du iš jų turi tokį patį elektroforetinį judrumą, kaip ir baltymo-DNR kompleksai, susidarantys sumaišant fermentą tik su 12 bp arba

30 bp DNR dupleksais, tuo tarpu trečiasis pasižymėjo tarpiniu elektroforetiniu judrumu. Tokio tarpinio baltymo-DNR komplekso susidarymą galima paaiškinti tik tuo, kad Bse634I tetrameras geba vienu metu surišti vieną 12 bp ir vieną 30 bp DNR dupleksą. Todėl specifiniuose kompleksuose su 12 bp arba 30 bp dupleksais viena Bse634I tetramero molekulė yra surišusi dvi DNR molekules. Skirtingai negu laukinis fermentas, W228A mutantas nesudarė tarpinio baltymo-DNR komplekso (7 pav. (B)). Tai rodo, kad dimerinis W228A mutantas geba surišti tik vieną DNR molekulę.

1.5. Plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I ir W228A mutantu

Pagal galiojančią restrikcijos fermentų nomenklatūrą wt Bse634I ir W228A mutantas turėtų būti priskirti skirtingiems potipiams. Restrikcijos endonukleazė Bse634I, kaip ir kitos IIF tipo restrikcijos endonukleazės (SfiI, Cfr10I ir NgoMIV), yra homotetrameras, gebantis vienu metu surišti dvi atpažinimo seką turinčias DNR molekules (Deibert ir kiti, 2000; Siksnys ir kiti, 1999; Wentzell ir kiti, 1995). Tuo tarpu W228A mutantas yra homodimeras, galintis sąveikauti tik su viena DNR molekule, panašiai kaip dimerinės IIP tipo restrikcijos endonukleazės (MunI, EcoRI, BamHI) (Deibert ir kiti, 1999; Pingoud ir kiti, 2005).

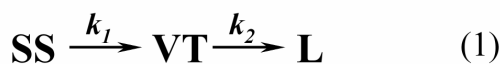
Tetrameriniai restrikcijos fermentai gali ne tik surišti dvi atpažinimo DNR sekas, bet ir koordinuotai jas perkirpti, t.y. viename fermento-DNR komplekse yra sutartinai hidrolizuojami visi keturi dviejų taikinių fosfodiesteriniai ryšiai (Nobbs ir kiti, 1998a). Anksčiau yra parodyta, kad Bse634I, kaip ir kitų IIF tipo fermentų, optimaliam aktyvumui reikalingas dviejų DNR taikinių surišimas (Grazulis ir kiti, 2002). Dėl šios priežasties, Bse634I plazmidinę DNR su viena atpažinimo seka perkerpa žymiai lėčiau negu su dviem taikiniai. Be to, vieną Bse634I taikinį turinčios plazmidinės DNR karpymo greitis gali būti padidintas į reakcijos mišinį pridėjus specifinio DNR duplekso (Grazulis ir kiti, 2002).

Paprastas ir patikimas būdas patikrinti, ar restrikcijos fermento optimaliam aktyvumui reikalinga sąveika su dviem specifiniais DNR taikiniai, yra atlikti superspiralizuotų vieną ir du fermento taikinius turinčių plazmidinių substratų karpymo eksperimentus. Įprasti homodimeriniai restrikcijos fermentai abu plazmidinius substratus karpą vienodu greičiu, tuo tarpu fermentai, reikalaujantys sąveikos su dviem taikiniai, žymiai greičiau karpą du taikinius turintį substratą (Bath ir kiti, 2002; Embleton ir kiti, 2001; Welsch ir kiti, 2004). Siekiant nustatyti ir palyginti tetramerinio Bse634I fermento ir dimerinio W228A mutanto katalitinius aktyvumus, mes atlikome kinetinius plazmidinės DNR hidrolizės tyrimus. Substratu naudota superspiralizuota plazmidžių pUCAT1 ir pUCAT2 DNR, turinti, atitinkamai, vieną ir dvi Bse634I atpažinimo sekas ACCGGT. Kinetiniai eksperimentai atlikti 25 °C temperatūroje esant fiksuotai plazmidinės DNR koncentracijai (2.3 nM) ir įvairiems (1-1000 kartų) fermento pertekliams (žr. „Tyrimų metodiką“).

1.5.1. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė W228A mutantu

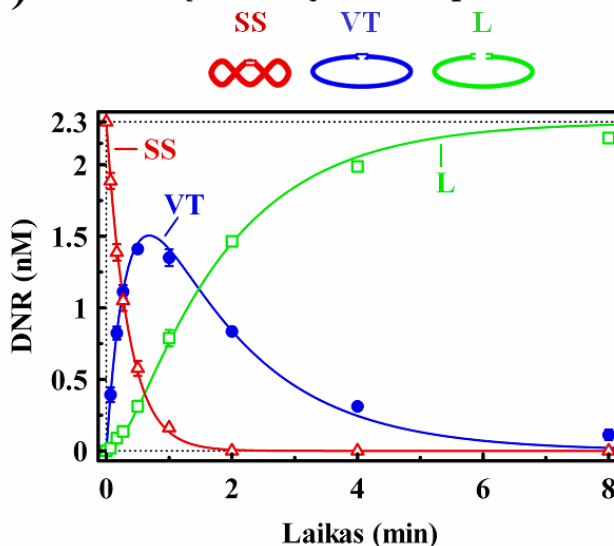
Superspiralizuotos vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR karpymas W228A mutantu vykdytas esant „sotinančiai“ (2.5 μM dimero) fermento koncentracijai (8 pav. (A)). Esant tokiai fermento koncentracijai yra stebimas maksimalus plazmidinės DNR hidrolizės greitis ir tolimesnis fermento koncentracijos didinimas reakcijos greičio nekeičia. W228A mutanto atveju vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizės eiga panaši į būdingą įprastiems IIP tipo restrikcijos fermentams. Pradžioje perkerpama viena superspiralizuotos (SS) DNR grandinė, susidarant viengrandį trūkį turinčiai (VT) plazmidinei DNR, kuri reakcijos eigoje

viršta galutiniu reakcijos produktu – linijine (L) DNR su dviem perkirptomis DNR grandinėmis. Reakcija kiekybiškai aprašyta remiantis paprasta nuoseklios reakcijos schema:

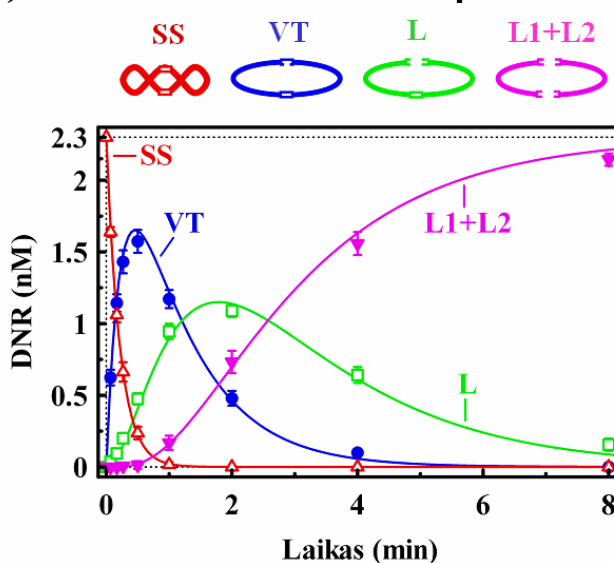


kur k_1 ir k_2 yra atitinkamai viengrandžio ir dvigrandžio trūkių įvedimo greičio konstantos. Greičio konstantų reikšmės pateiktos 2 lentelėje.

(A) Vieną taikinį turinti plazmidė



(B) Du taikinius turinti plazmidė



8 pav. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė W228A mutantu (Zaremba ir kiti, 2005). Paveikslėliai virš grafikų iliustruoja įvairias DNR formas, kurios gali susidaryti karpant vieną ir du taikinius turinčią plazmidinę DNR Bse634I fermentu. Du taikinius turinčios plazmidės atveju, VT ir L formos gali turėti papildomus viengrandžius trūkius antrame DNR taikinyje. Reakcijos vykdytos kaip aprašyta "Tyrimų metodikoje". Reakcijos mišiniuose buvo 2.3 nM vieną taikinį (A) ir du taikinius (B) turinčios plazmidinės DNR ir 2500 nM (dimero) W228A. Parodyti superspiralizuotos SS (Δ), žiedinės su viengrandžiu trūkiu VT (\bullet), linijinės L (\square) ir turinčios du dvigrandžius trūkius L1+L2 (\blacktriangledown , tik (B) skiltyje) plazmidinės DNR formų kiekiai. Kinetinės kreivės aprašytos reakcijos schemą (1) atitinkančiais sprendiniais (išsistinės linijos). Gautas optimalios greičio konstantų reikšmės pateiktos 2 lentelėje.

Du taikinius turinčios plazmidinės DNR karpymas W228A mutantu vyksta pagal mechanizmą, būdingą IIP tipo restrikcijos fermentams (8 pav. (B)). Reakcijos metu SS DNR pradžioje paverčiama VT forma, tada perkerpama antra DNR grandinė viename iš dviejų taikinių susidarant L formai, kuri, perkirpus antrąją DNR grandinę kitame taikinyje, galiausiai virsta dviejais linijiniais fragmentais L1+L2. Ši reakcija kiekybiškai aprašyta remiantis modifikuota reakcijos schema (1), padarius prielaidą, kad pirmo ir antro DNR taikinių karpymas toje pačioje plazmidės molekulėje vyksta nepriklausomai. Nustatytos reakcijos greičio konstantų reikšmės k_1 ir k_2 yra beveik identiškos pUCAT1 ir pUCAT2 plazmidžių atvejais (žr. 2 lentelę). Taigi dimerinis W228A mutantas elgiasi kaip įprastinis IIP tipo restrikcijos fermentas, kurio maksimaliam katalitiniam aktyvumui nereikalingas antrojo specifinio DNR taikinio surišimas ir individualių DNR taikinių abi grandines perkerpamos nepriklausomai.

2 lentelė. Plazmidinės DNR hidrolizės greičiai.

Fermentas	Fermento koncentracija	Plazmidinė DNR	Greičio konstantos	
			k_1, min^{-1}	k_2, min^{-1}
wt Bse634I	Sotinanti	pUCAT1	0.094(± 0.010) ^a	0.054(± 0.008) ^a
		pUCAT2	0.088(± 0.008) ^a	0.056(± 0.008) ^a
		pUC0 ^c	0.0027(± 0.0003) ^b	-
	Optimali	pUCAT1	0.26(± 0.04) ^b	-
		pUCAT2	2.7(± 0.3) ^b	-
		pUC0 ^c	0.0024(± 0.0004) ^b	-
W228A	Sotinanti	pUCAT1	2.9(± 0.3) ^a	0.62(± 0.05) ^a
		pUCAT2	2.3(± 0.3) ^a	0.53(± 0.05) ^a
		pUC0 ^c	0.0024(± 0.0004) ^b	-

^a k_1 ir k_2 atitinkamai yra viengrandžio ir dvigrandžio trūkių įvedimo greičio konstantos, gautos eksperimentinius vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR karpymo duomenis aprašant reakcijos schema (1)(žr. „Tyrimų metodiką“).

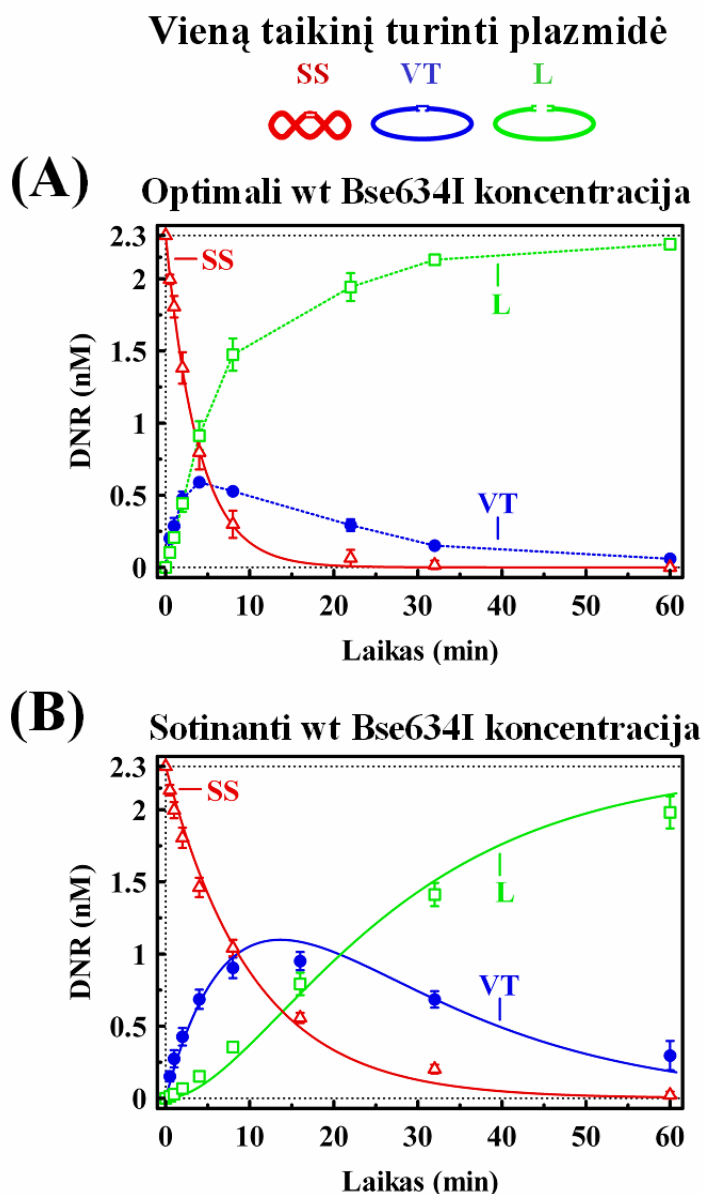
^b Greičio konstantos, gautos superspiralizuoto substrato nykimą laike aprašant viena eksponente.

^c pUC0 yra Bse634I atpažinimo sekų neturinti plazmidė.

1.5.2. Vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I

Didžiausias vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizės greitis, karpant ją wt Bse634I fermentu, yra stebimas esant 50 nM tetramero koncentracijai (9 pav. (A)). Tačiau šiuo atveju reakcijos eigai aprašyti schema (1) netinka. Todėl superspiralizuotos DNR nykimo kreivė aprašyta viena eksponente ir surasta pirmos eilės viengrandžio trūkio įvedimo greičio konstanta k_{obs} (žr. 2 lentelę). Fermento koncentracijos padidėjimas iki 125 nM (tetramero) sumažino plazmidinės DNR hidrolizės greitį (9 pav. (B)). Tolimesnis fermento koncentracijos didinimas iki 500 nM reakcijos greičio nepakeitė. Tai rodo, kad substrato įsotinimas fermentu yra pasiekiamas 125-500 nM koncentracijų intervale. Skirtingai negu optimalios fermento koncentracijos atveju (9 pav. (A)), esant sotinančiai fermento koncentracijai, reakcijos eigai tinka aprašymas schema (1). Esant optimaliai wt Bse634I koncentracijai viengrandžio trūkio įvedimas yra apie 3 kartus greitesnis negu esant sotinančiai fermento koncentracijai. Tačiau net esant optimaliai laukinio fermento koncentracijai viengrandžio trūkio įvedimas vieną taikinį

turinčioje plazmidinėje DNR vyksta mažiausiai 10 kartų lėčiau negu W228A mutanto atveju (žr. 2 lentelę).

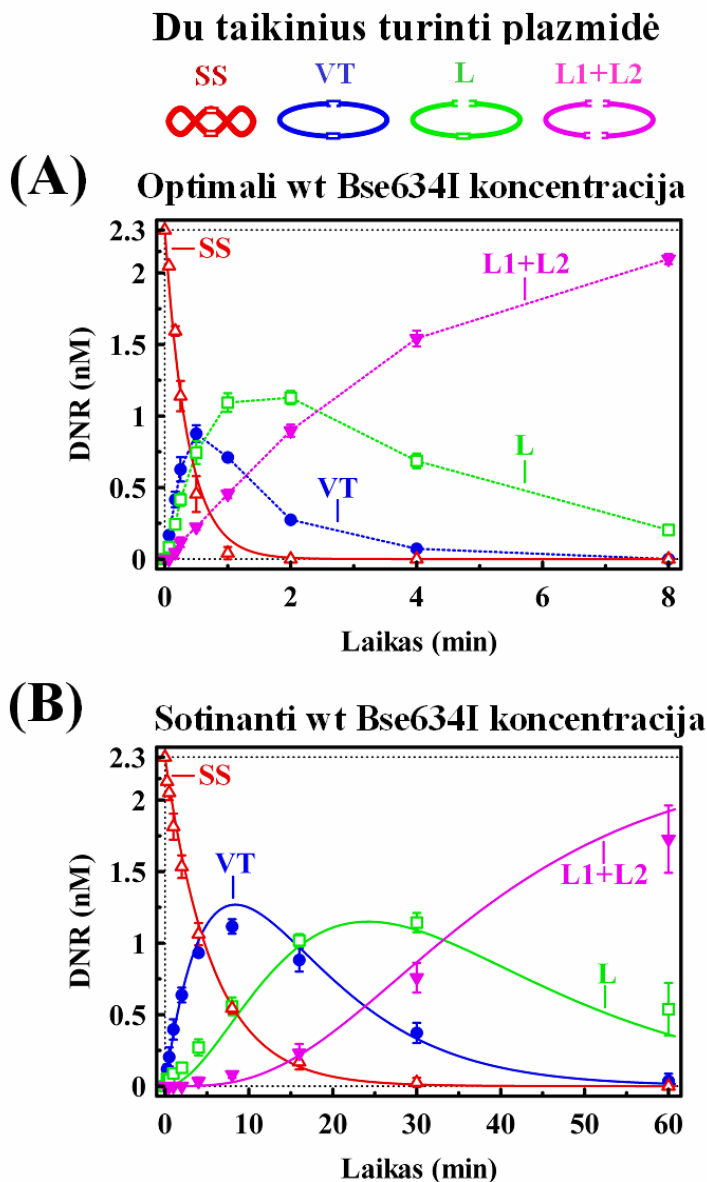


9 pav. Vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizė esant įvairioms wt Bse634I fermento koncentracijoms (Zaremba ir kiti, 2005). Paveikslėliai virš grafikų iliustruoja įvairias DNR formas, kurios gali susidaryti karpant vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR Bse634I fermentu. Reakcijos vykdytos reakcijos kaip aprašyta "Tyrimų metodikoje". Reakcijos mišiniuose buvo 2.3 nM vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR ir 50 nM (A) arba 125 nM (B) wt Bse634I tetramero. Parodyti superspiralizuotos SS (Δ), žiedinės su viengrandžiu trūkiu VT (\bullet), linijinės L (\square) plazmidinės DNR formų kiekiai. Kinetinės kreivės aprašytos vieną eksponentę (A skiltyje) arba reakcijos schemą (1) (B skiltyje) atitinkančiais sprendiniais (ištinės linijos). Gautos optimalios greičio konstantų reikšmės pateiktos 2 lentelėje.

1.5.3. Du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I

Du taikinius turinčios plazmidės atveju maksimalus DNR hidrolizės greitis yra stebimas esant optimaliai 5.0-10.0 nM wt Bse634I tetramero koncentracijai (10 pav. (A)). Tačiau reakcijos eigai aprašyti netiko paprasta nuoseklios reakcijos schema. Todėl, kaip ir vieną taikinį turinčios plazmidės atveju, esant optimaliai fermento koncentracijai, mes nustatėme tik

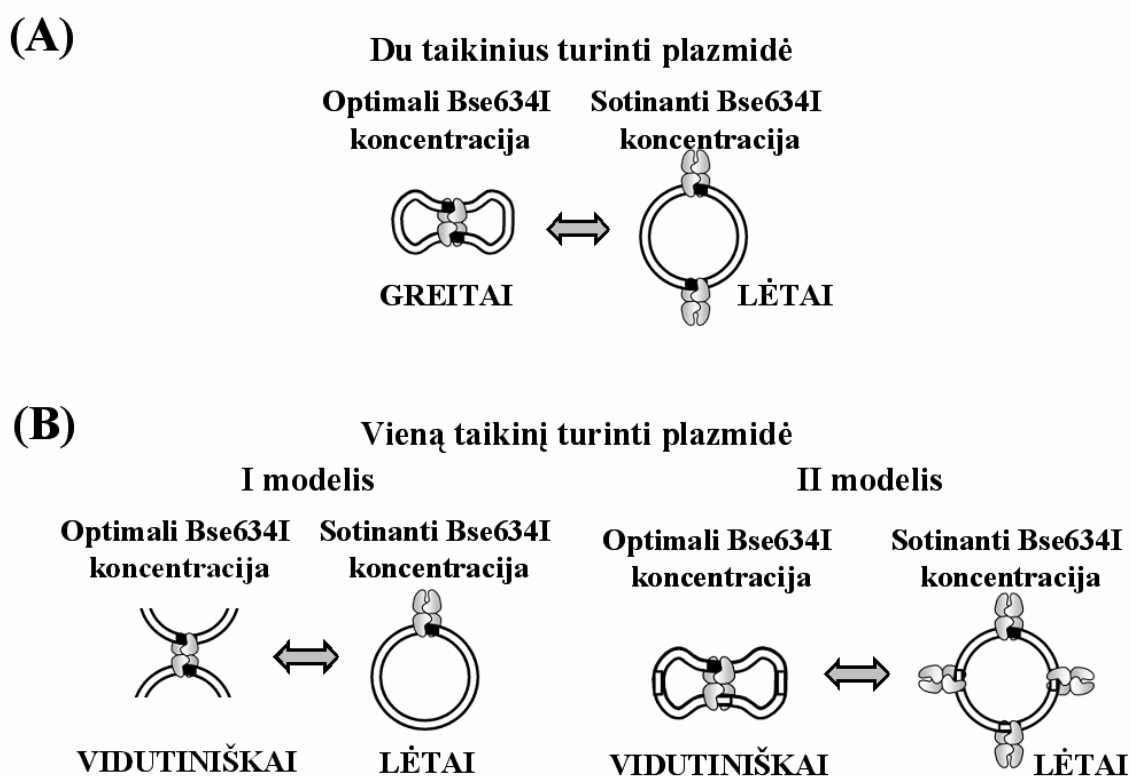
viengrandžio trūkio įvedimo greičio konstantą k_{obs} (žr. 2 lentelę). Padidinus fermento koncentraciją iki ≥ 125 nM, yra stebima žymi pUCAT2 DNR hidrolizės inhibicija (10 pav. (B)). Esant tokioms sąlygoms, du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė gali būti kiekybiškai aprašyta remiantis schema (1), kas leidžia manyti, kad fermentas du plazmidės taikinius karmo nepriklausomai. Be to, esant sotinančiai fermento koncentracijai, greičio konstantų reikšmės k_1 ir k_2 yra beveik tokios pačios vieną ir du taikinius turinčių plazmidžių atvejais (žr. 2 lentelę).



10 pav. Du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė esant įvairioms wt Bse634I fermento koncentracijoms (Zaremba ir kiti, 2005). Paveikslėliai virš grafikų iliustruoja įvairias DNR formas, kurios gali susidaryti karpant du taikinius turinčią plazmidinę DNR Bse634I fermentu. VT ir L formos gali turėti papildomus viengrandžius trūkius antrame DNR taikinyje. Reakcijos vykdytos reakcijos buferyje (žr. “Tyrimų metodiką”). Reakcijos mišiniuose buvo 2.3 nM du taikinius turinčios plazmidinės DNR ir 5 nM (A) arba 125 nM (B) wt Bse634I tetramero. Parodyti superspiralizuotos SS (Δ), žiedinės su viengrandžiu trūkiu VT (\bullet), linijinės L (\square) ir turinčios du dvigrandžius trūkius L1+L2 (\blacktriangledown) plazmidinės DNR formų kiekiai. Kinetinės kreivės aprašytos vieną eksponentę (A skiltyje) arba reakcijos schema (1) ((B) skiltyje) atitinkančiais sprendiniais (išsitiesinė linijos). Gautos optimalios greičio konstantų reikšmės pateiktos 2 lentelėje.

1.5.4. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR karpymo wt Bse634I mechanizmai

Plazmidinę DNR karpant įprastinėmis IIP tipo restrikcijos endonukleazėmis, hidrolizės reakcijos greitis didinant fermento koncentraciją auga hiperboliškai, kol tampa pastovus (Sasnauskas ir kiti, 1999; Taylor ir Halford, 1989). Tačiau wt Bse634I atveju, vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizės greitis didėja iki tam tikros optimalios fermento koncentracijos ir, toliau didinant fermento koncentraciją, sumažėja ir tampa pastovus, esant sotinančiai fermento koncentracijai (žr. 2 lentelę, 9 ir 10 pav.). Du taikinius turinčios plazmidės atveju katalizei palankūs sinaptiniai Bse634I tetramero kompleksai su dviem *in cis* (t.y. toje pačioje plazmidinės DNR molekulėje) esančiais atpažinimo taikiniais turėtų dominuoti esant optimaliai fermento koncentracijai (11 pav. (A)), ir suirti esant didelėms fermento koncentracijoms, ko pasekoje sumažėja DNR hidrolizės greitis. Esant sotinančiai fermento koncentracijai, tetramerinis Bse634I fermentas elgiasi panašiai kaip įprastiniai dimeriniai restrikcijos fermentai: vienodu greičiu hidrolizuoja vieną ir du taikinius turinčius plazmidinius substratus ir nepriklausomai perkerpa individualius *in cis* esančius DNR taikinius (žr. 2 lentelę, 11 pav. (A)). Panašus du taikinius turinčios plazmidės hidrolizės greičio sumažėjimas, esant didelėms fermento koncentracijoms, anksčiau yra aprašytas tetramerinės restrikcijos endonukleazės SfiI atveju (Szczelkun ir Halford, 1996).



11 pav. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR karpymo wt Bse634I mechanizmai (Zaremba ir kiti, 2005). Paveikslėliai (A) ir (B) skiltyse schematiškai iliustruoja plazmidinių substratų karpymą esant įvairioms wt Bse634I fermento koncentracijoms. Esant optimalioms fermento koncentracijoms, susidaro katalizei palankūs sinaptiniai Bse634I tetramero kompleksai su dviem specifiniais DNR taikiniais, esančiais *in cis* (A), su dviem specifiniais DNR taikiniais, esančiais *in trans* (I modelis (B) skiltyje) arba su vienu specifiniu (pilnaviduriai stačiakampiai) ir vienu nekanoniniu (tuščiaviduriai stačiakampiai) DNR taikiniais, esančiais *in cis* (II modelis, (B) skiltyje). Susidarant sinaptiniams kompleksams pagreitėja plazmidinės DNR karpymo greitis. Esant sotinančioms fermento koncentracijoms, visi sinaptiniai kompleksai suyra ir yra stebimas lėtas plazmidinės DNR karpymas.

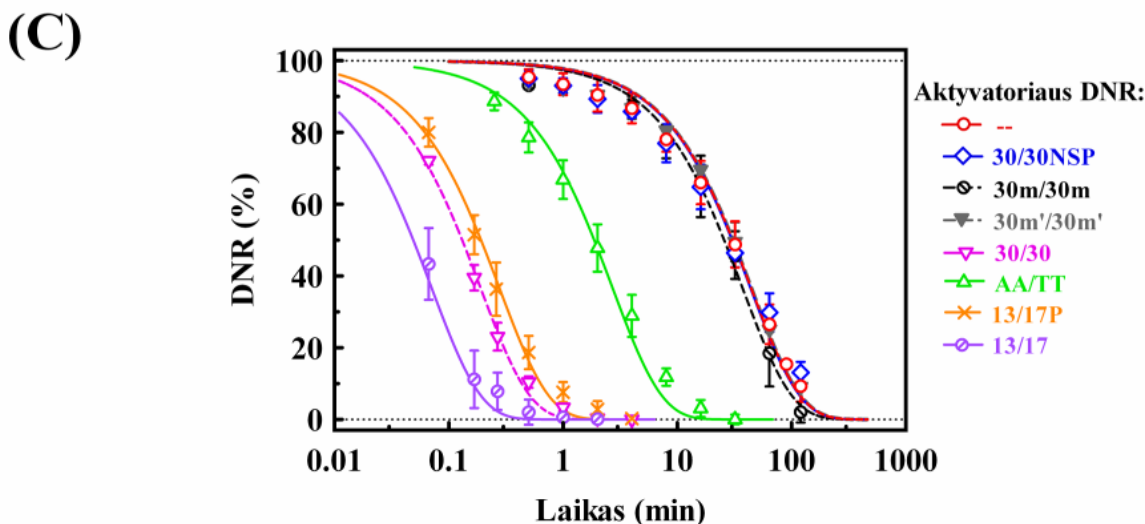
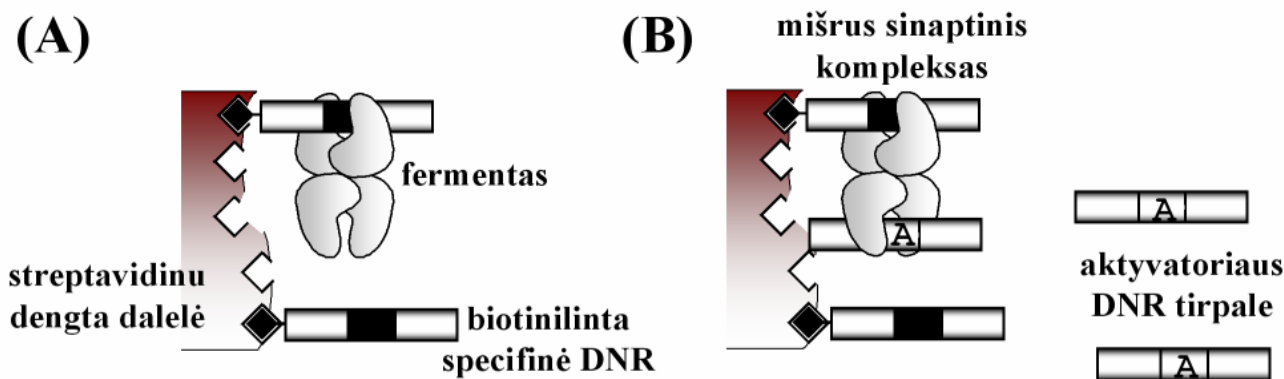
Optimalios wt Bse634I fermento koncentracijos egzistavimas, karpant vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR, buvo kiek netikėtas. Tai būtų galima paaiškinti fermento tetramero gebėjimu sudaryti sinaptinius kompleksus su dviem DNR atpažinimo taikiniiais, esančiais *in trans*, t.y. skirtingose superspiralizuotos plazmidės molekulėse (žr. I modelį 11 pav. (B)). Tokių sinaptinių kompleksų suirimas, esant didesnėms fermento koncentracijoms, turėtų sąlygoti reakcijos greičio sumažėjimą. Tačiau dėl erdvinių trukdymų, atsirandančių mažame tūryje suartinant dvi superspiralizuotos DNR molekules, fermento sinaptiniai kompleksai su *in trans* esančiais taikiniiais yra nestabilūs (Wentzell ir kiti, 1995). Kitaip optimalios fermento koncentracijos egzistavimą galima būtų paaiškinti padarius prielaidą, kad fermento tetrameras geba sudaryti katalizei palankius sinaptinius kompleksus su *in cis* esančiais vienu specifiniu DNR taikiniu ir kitu į jį panašiu (nekanoniniu) DNR taikiniu. Esant didelėms fermento koncentracijoms, individualūs tetramerai galėtų surišę nekanoninius DNR taikinius, suirant mišriems sinaptiniams kompleksams (žr. II modelį 11 pav. (B)), o tai sąlygotų substrato hidrolizės greičio sumažėjimą. Siekdami patikrinti šias hipotezes, mes atlikome seriją eksperimentų, kuriuose naudojome oligonukleotidinius substratus.

1.6. Imobilizuotos DNR hidrolizė wt Bse634I ir W228A mutantu

Pradžioje mes patikrinome, ar wt Bse634I pasižymi katalitiniu aktyvumu, kai fermento tetrameras yra surišęs tik vieną DNR molekulę. Siekiant išvengti tetramero sinaptinių kompleksų su dviem DNR molekulėmis susidarymo, mes specifinį oligonukleotidinį dupleksą bio-30/30, turintį Bse634I atpažinimo seką, prijungėme prie kieto paviršiaus (žr. 1 lentelę) (Sasnauskas ir kiti, 2003). Dupleksas bio-30/30, turintis ³³P-žymę apatinėje grandinėje ir biotino liekaną viršutinės grandinės 5'-gale, buvo imobilizuotas ant streptavidinu dengtų dalelių paviršiaus (12 pav. (A)). Oligonukleotidas užpildė mažiau negu 1 % galimų biotino surišimo vietų. Esant tokiam mažam DNR tankiui ant kieto paviršiaus, vienas fermento tetrameras negali sąveikauti su dviem imobilizuotomis DNR molekulėmis vienu metu. Tačiau net esant šioms eksperimentinėms sąlygoms wt Bse634I sugebėjo karpyti imobilizuotą DNR (12 pav. (C)). Esant mažesniems imobilizuotos DNR tankiams, buvo stebimas panašus DNR karpymas (duomenys nepateikti). Šie duomenys rodo, kad fermento tetramero sąveika su dviem DNR molekulėmis nėra absoliučiai būtina katalitinio Bse634I aktyvumo sąlyga.

Skirtingai negu plazmidinių substratų atveju, eksperimentuose su oligonukleotidiniais substratais mes negalėjome tiesiogiai ir nepriklausomai stebėti pirmo ir antro viengrandžių trūkių įvedimo substrate. Todėl imobilizuoto DNR substrato nykimas buvo aprašytas viena eksponente ir paskaičiuota pirmos eilės tariama greičio konstanta k_{obs} . Reiktų pastebėti, kad rasta imobilizuoto oligonukleotido hidrolizės Bse634I greičio konstantos reikšmė (žr. 3 lentelę) yra artima viengrandžio trūkio įvedimo greičio konstantos reikšmei (žr. 2 lentelę), karpant vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR esant sotinančiai fermento koncentracijai. Taigi, esant sotinančiai Bse634I koncentracijai, vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR karpymas, panašiai kaip ir imobilizuotos DNR, vyksta fermentui sąveikaujant su viena savo atpažinimo DNR seka.

Reakcijos greičio konstantos reikšmė (žr. 3 lentelę), karpant imobilizuotą DNR dimeriniu W228A mutantu, yra artima viengrandžio trūkio įvedimo vieną ir du taikinius turinčioje plazmidinėje DNR greičio konstantos reikšmei (žr. 2 lentelę). Šie duomenys rodo, kad DNR imobilizacija neturi didelės įtakos substrato hidrolizės reakcijos greičiui, ir W228A mutantas elgiasi kaip įprastas IIP tipo restrikcijos fermentas, galintis sąveikauti tik su viena DNR molekule.



12 pav. Imobilizuotos DNR hidrolizė wt Bse634I fermentu (Zaremba ir kiti, 2005). Paveikslėliai (A) ir (B) skiltyse vaizduoja eksperimentų strategiją. Specifinis DNR dupleksas (Bse634I atpažinimo seka pavaizduota juodu stačiakampiu) bio-30/30 (1.0 nM) (žr. 1 lentelę), turintis biotino liekaną viršutinės DNR grandinės 5'-gale ir ³³P-žymę apatinėje grandinėje, buvo mažu tankiu imobilizuotas ant streptavidinu dengtų magnetinių dalelių. Imobilizuotos DNR karpymas buvo stebimas pridėjus 125-250 nM tetramerinio wt Bse634I fermento. Esant mažam imobilizuotos DNR tankiui ant kieto paviršiaus, fermento tetrameras vienu metu gali sąveikauti tik su viena DNR molekule, todėl nesudaro sinaptiniai tetramero kompleksai su dviem DNR molekulėm ((A) skiltis). Įvairūs biotino liekanos neturinčių DNR duplesų kiekiai buvo pridėti į reakcijos mišinį, siekiant, kad susidarytų sinaptiniai fermento tetramero kompleksai su imobilizuota DNR ir DNR iš tirpalo ((B) skiltis). (C) Specifinės imobilizuotos DNR karpymas tirpale esant įvairiai DNR: 250 nM nespecifinio duplekso 30/30NSP, 250 nM specifinio duplekso 30/30, 500 nM reakcijos produkta imituojančių duplesų 13/17P ir 13/17, 250 nM nekanoninio duplekso AA/TT ir 250 nM specifinių metilintų duplesų 30m/30m ir 30m'/30m' (1 lentelė). Kinetinės imobilizuoto substrato nykimo kreivės nesant ir esant aktyvatoriaus DNR aprašytos vieną eksponentę atitinkančiais sprendiniais (ištisinės linijos). Gautos optimalios greičio konstantų reikšmės pateiktos 3 lentelėje.

3 lentelė. Imobilizuoto specifinio duplexo bio-30/30 hidrolizės aktyvacija pridėjus įvairios DNR.

Fermentas	DNR duplexas tirpale	Greičio konstanta k_{obs} , min ^{-1a}
wt Bse634I	-	0.023(± 0.001)
	Nespecifinis 30/30NSP	0.023(± 0.002)
	Metilintas 30m/30m	0.027(± 0.002)
	Metilintas 30m'/30m'	0.023(± 0.001)
	Specifinis 30/30	5.3(± 0.6)
	Nekanoninis AA/TT	0.37(± 0.09)
	Produktinis 13/17P	4.1(± 0.7)
	Produktinis 13/17	14(± 6)
W228A	-	0.75(± 0.02)

^a Greičio konstanta k_{obs} buvo gauta imobilizuoto substrato nykimą laike aprašant viena eksponente.

1.6.1. Imobilizuotos DNR hidrolizės aktyvacija

Specifinio oligonukleotido imobilizavimas mažu tankiu ant dalelių paviršiaus neleidžia susidaryti sinaptiniams Bse634I tetramero kompleksams su dviem DNR molekulėmis (12 pav. (A)) ir todėl sąlygoja lėtą imobilizuotos DNR karpymą (žr. 3 lentelę). Tačiau į dalelių suspensiją pridėjus specifinio DNR duplexo, neturinčio biotino liekanos, Bse634I tetramerai galėtų sudaryti sinaptinius kompleksus su viena imobilizuota DNR molekule ir viena DNR molekule iš tirpalo (12 pav. (B)). Tokie eksperimentai buvo atlikti siekiant nustatyti, ar įvairios DNR sekos (pvz.: specifinė, nekanoninė ar nespecifinė) galėtų aktyvuoti imobilizuotos DNR karpymą.

Pradžioje mes ištyrėme specifinio DNR duplexo įtaką imobilizuoto specifinio oligonukleotido karpymui. Pridėjus specifinio 30/30 (žr. 1 lentelę) duplexo (100-1000 nM) į reakcijos mišinį, kuriame yra ~1.0 nM imobilizuoto bio-30/30 duplexo ir 125 nM (tetramero) wt Bse634I, buvo stebima žymi prijungtos prie kieto paviršiaus DNR hidrolizės stimuliacija (žr. 3 lentelę, 12 pav. (C)). Šie duomenys rodo, kad wt Bse634I fermentas geba formuoti katalizei palankius sinaptinius kompleksus su imobilizuotu oligonukleotidu ir kita oligonukleotido molekule iš tirpalo.

Kitame darbo etape ištyrėme nekanoninio AA/TT DNR duplexo įtaką imobilizuotos DNR hidrolizės greičiui. Šis DNR duplexas turi ACCGGA DNR seką, kuri nuo Bse634I atpažinimo sekos skiriasi tik viena bazių pora (skirtinga bazių pora pabraukta, žr. 1 lentelę). Šiuo atveju taip pat buvo stebima imobilizuoto specifinio oligonukleotido hidrolizės aktyvacija, nors ir silpnesnė negu specifinio DNR duplexo atveju (žr. 3 lentelę, 12 pav. (C)). Oligonukleotinis duplexas TA/TA (žr. 1 lentelę), kuris nuo Bse634I atpažinimo sekos skiriasi dviem bazių poromis, pasižymėjo panašiu aktyvuojančiu poveikiu, kaip ir AA/TT duplexas (duomenys nepateikti). Tuo tarpu nespecifinio (30/30NSP) arba specifinių metilintų (30m/30m ir 30m'/30m') DNR duplexų (žr. 1 lentelę) atvejais imobilizuotos DNR karpymo aktyvacija nebuvo stebima (žr. 3 lentelę, 12 pav. (C)).

Atlikdami imobilizuotos specifinės DNR hidrolizės eksperimentus, mes tuo pačiu metu stebėjome tirpale esančios specifinio ir nekanoninio aktyvatorinių oligonukleotidų karpymą. Specifinis 30/30 DNR duplexas laukinio tipo Bse634I fermentu karpomas panašiu greičiu kaip ir imobilizuota specifinė DNR. Tuo tarpu žymesnio nekanoninių aktyvatorių (AA/TT ir AT/AT) DNR karpymo nepastebėta (duomenys nepateikti).

Aktyvacijos eksperimentų rezultatai rodo, kad wt Bse634I tetramerai sudaro katalizei palankius sinaptinius kompleksus ne tik su dviem specifinėmis atpažinimo sekomis, bet ir sugeba sudaryti mišrius kompleksus, kuriuose tetrameras yra surišęs vieną specifinį ir vieną nekanoninį DNR taikinius. Todėl vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR karpymas gali vykti susidarant mišriems sinaptiniams wt Bse634I tetramero kompleksams su toje pačioje plazmidės molekulėje esančiais vienu specifiniu ir vienu nekanoniniu DNR taikiniiais (žr. II modelį 11 pav. (B)). Tokie mišrūs kompleksai susiformuoja esant optimaliai (50 nM tetramero) wt Bse634I koncentracijai ir suyra esant sotinančiai (≥ 125 nM tetramero) fermento koncentracijai, kas sąlygoja sumažėjusį karpymo greitį (9 pav.).

Wt Bse634I fermentas savo gebėjimu sudaryti mišrius (specifinis-nekanoninis) sinaptinius kompleksus skiriasi nuo kito IIF tipo restrikcijos fermento SfiI, kuris sudaro sinaptinius kompleksus tik su dviem specifiniais DNR taikiniiais (Embleton ir kiti, 1999; Nobbs ir kiti, 1998b). Manoma, kad ši SfiI savybė užtikrina didesnę fermento specifiškumą savo atpažinimo sekai. Toks argumentas negalioja Bse634I fermentui, kuris geba vienu metu surišti specifinį ir nekanoninį taikinius, tačiau kerpa tik specifinį taikinį. Be to, skirtingai nuo SfiI (Nobbs ir kiti, 1998b), Bse634I atveju specifinio taikinio karpymo aktyvacija gali vykti komplekse, kuriame viena iš dviejų surišėtų DNR molekulių yra nekarpona.

Skirtingai nuo laukinio tipo fermento, dimerinio W228A mutanto atveju nekanoninio AA/TT DNR duplekso pridėjimas į reakcijos mišinį neturėjo įtakos imobilizuotos DNR karpymui (duomenys nepateikti). Tuo tarpu specifinio 30/30 DNR duplekso pridėjimas inhibavo imobilizuotos DNR karpymą (duomenys nepateikti). Šie duomenys rodo, kad W228A mutanto atveju specifinė imobilizuota DNR ir specifinė DNR iš tirpalo konkuruoja dėl to paties DNR surišimo centro baltyme. Taigi, dimerinis W228A mutantas elgiasi kaip įprastinis IIP tipo fermentas, galintis vienu metu sąveikauti tik su viena DNR molekule. Savo savybėmis W228A skiriasi nuo restrikcijos fermento SgrAI, kuris, sąveikaudamas su viena savo atpažinimo DNR seka, tirpale yra dimeras, tačiau du SgrAI dimerai, sąveikaudami su dviem toje pačioje DNR molekulėje esančiais specifiniais taikiniiais, sudaro tetramerą ir greitai bei sutartinai perkerpa abu DNR taikinius (Daniels ir kiti, 2003).

1.6.2. Reakcijos produktas aktyvuoja specifinės DNR karpymą wt Bse634I fermentu

Restrikcijos endonukleazės SgrAI atveju yra parodyta, kad reakcijos DNR produktas aktyvuoja specifinio DNR taikinio karpymą (Bitinaite ir Schildkraut, 2002; Hingorani-Varma ir Bitinaite, 2003). Be to, esant reakcijos produktui, SgrAI geba kirpti ir nekanoninius DNR taikinius, kurie nuo atpažinimo sekos skiriasi viena bazių pora (Bitinaite ir Schildkraut, 2002).

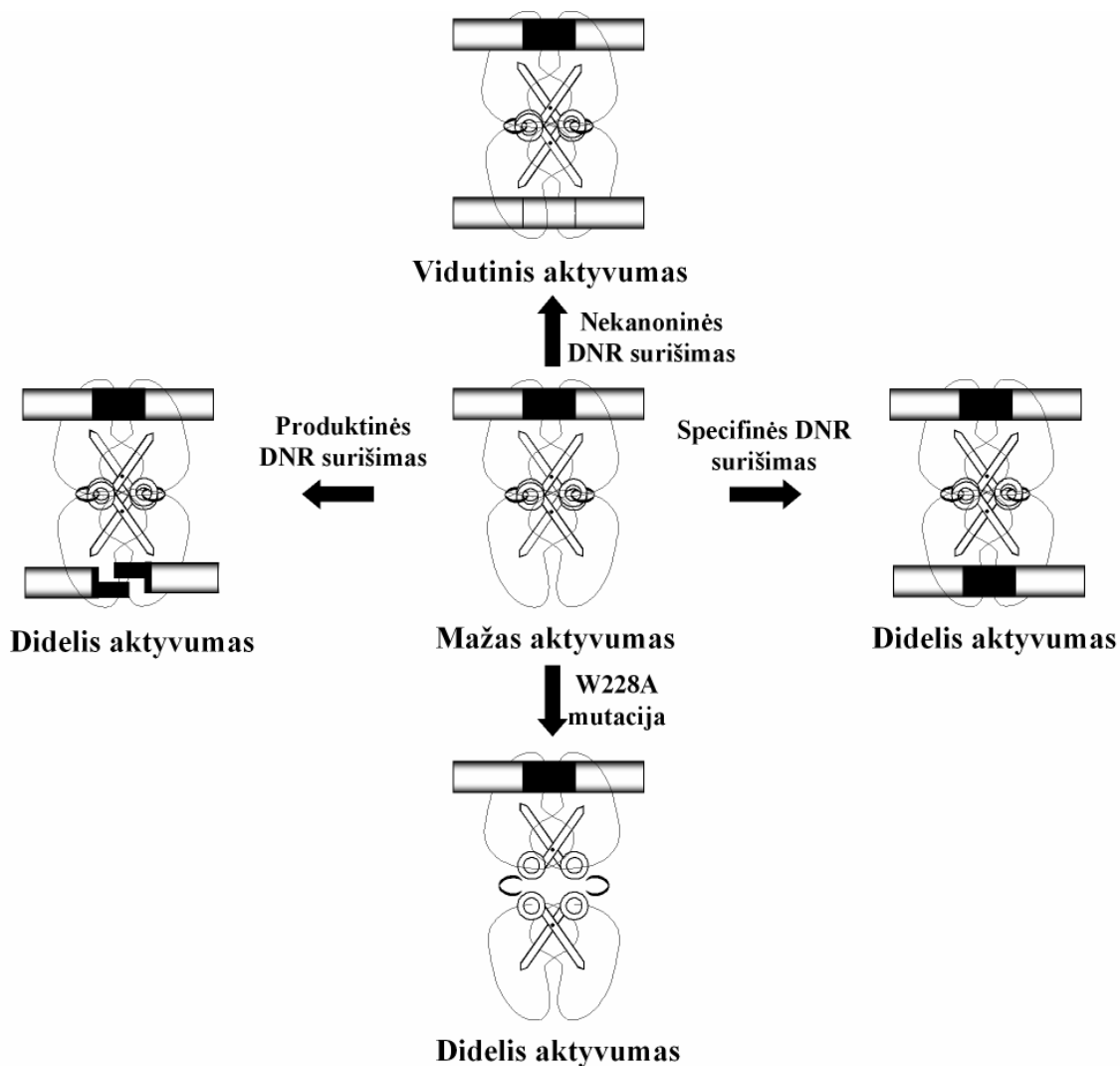
Siekiant patikrinti, ar wt Bse634I atveju reakcijos DNR produktas gali veikti kaip DNR hidrolizės aktyvatorius, mes atlikome eksperimentus, kuriuose imobilizuotos specifinės DNR karpymas tirtas tirpale esant oligonukleotidų dupleksams 13/17P ir 13/17, imituojančiams Bse634I reakcijos produktus (žr. 1 lentelę). Abiejų produktinių dupleksų (200-500 nM) pridėjimas į reakcijos mišinį, kuriame buvo ~ 1.0 nM imobilizuoto bio-30/30 duplekso ir 125 nM (tetramero) wt Bse634I, žymiai padidino imobilizuoto oligonukleotido hidrolizės greitį (12 pav. (C)). Taigi, Bse634I, kaip ir restrikcijos endonukleazė SgrAI, sugeba sudaryti katalizei palankius mišrius sinaptinius kompleksus su substrato ir produkto DNR molekulėmis. Produktinis 13/17P dupleksas imobilizuotos DNR hidrolizę aktyvavo panašiu lygiu, o 13/17 dupleksas, neturintis 5'-gale fosfato grupės, netgi labiau negu specifinis DNR dupleksas (žr. 3 lentelę).

1.7. DNR produktas neaktyvuoja nekanoninių taikinių karpymo wt Bse634I

Restrikcijos endonukleazė SgrAI kerpa tam tikrus nekanoninius DNR taikinius, jei reakcijos mišinyje yra specifinės DNR hidrolizės produkto (Bitinaite ir Schildkraut, 2002). Todėl mes nusprendėme patikrinti, ar ši savybė yra būdinga restrikcijos fermentui Bse634I. Inkubuojant Bse634I atpažinimo sekų neturinčią plazmidę pUC0 su wt Bse634I (125-1250 nM) arba W228A mutantu (2500-4000 nM), stebimas tik lėtas viengrandžio trūkio įvedimas ($k_{obs} \approx 0.003 \text{ min}^{-1}$, žr. 2 lentelę). Produktinių dupleksų (13/17P ir 13/17) pridėjimas į reakcijos mišinį nestimuliuoja plazmidinės DNR hidrolizės (duomenys nepateikti). Taigi, skirtingai negu SgrAI, restrikcijos endonukleazė Bse634I, esant aukščiau minėtoms eksperimentinėms sąlygoms, nesugeba suformuoti katalizei palankių sinaptinių kompleksų su nekanonine DNR ir DNR produktais.

1.8. Restrikcijos endonukleazės Bse634I katalitinio aktyvumo reguliacijos mechanizmas

Kinetiniai plazmidinių ir oligonukleotidinių DNR substratų karpymo duomenys rodo, kad vieną specifinį DNR taikinį surišusio Bse634I tetramero katalitinis aktyvumas yra žymiai mažesnis negu dimerinio W228A mutanto arba Bse634I tetramero, surišusio du specifinius DNR taikinius. Kaip jau minėta, Bse634I tetramerą sudaro du sukibę pirminiai dimerai, kurie turi po vieną DNR surišimo centrą ir primena įprastinę IIP tipo restrikcijos endonukleazę (1 pav. (A)). Eksperimentiniai duomenys rodo, kad Bse634I tetramero pirminio dimero aktyvumas priklauso nuo kito dimero būsenos (žr. „dvigubų žirklių“ modelį 13 pav.). Jei vienas iš pirminių dimerų nėra surišęs DNR, tai kito DNR surišusio dimero katalitinis aktyvumas yra labai mažas. Kitaip tariant, DNR nesurišęs dimeras slopina (autoinhibuoja) DNR surišusio dimero katalitinį aktyvumą. Dėl šios priežasties Bse634I fermentas, sąveikaudamas tik su vienu specifiniu DNR taikiniu, pasižymi žemu katalitiniu aktyvumu. Fermento konformaciniai pokyčiai dažnai yra būtina katalizės sąlyga (Gao, 2003; Hammes, 2002). Gali būti, kad Bse634I tetramere turi vykti suderinti pirminių dimerų konformaciniai pokyčiai, kad būtų sutartinai perkerpami du DNR taikiniai. Tuo atveju, kai tetrameras sąveikauja tik su vienu DNR taikiniu, DNR nesurišęs dimeras gali suvaržyti konformacinius pokyčius ir slopinti DNR surišusio dimero katalitinį aktyvumą. W228A mutacijos pagalba suardžius pirminių dimerų sąveikos paviršių, slopinimas yra pašalinamas ir pasireiškia „tikrasis“ dimero katalitinis aktyvumas (13 pav.). Autoinhibicija taip pat yra pašalinama, jei fermento tetrameras sudaro sinaptinį kompleksą, kuriame kitas dimeras yra surišęs antrą specifinį DNR taikinį arba reakcijos produktą. To pasekoje yra stebimas maksimalus Bse634I katalitinis aktyvumas. Neakanoninės DNR įjungimas į sinaptinį fermento kompleksą, nors ir mažesniu lygiu, tačiau taip pat stimuliuoja specifinės DNR karpymą.



13 pav. Restrikcijos endonukleazės Bse634I katalitinio aktyvumo reguliacijos mechanizmas (Zaremba ir kiti, 2005). Pirminiai Bse634I tetramero dimerai komunikuoja DNR karpymo metu. Jei Bse634I tetrameras yra surišęs tik vieną specifinį DNR taikinį (Bse634I atpažinimo seka pavaizduota juodu stačiakampiu), tai DNR nesurišęs dimeras slopina DNR surišusio dimero aktyvumą (mažo aktyvumo būseną). Antro specifinio DNR taikinio arba reakcijos produkto surišimas sąlygoja didelį tetramero aktyvumą. Nors ir mažesniu lygiu, tačiau specifinio DNR taikinio karpymas yra aktyvuojamas, jei į fermento sinaptinį kompleksą surišamas nekanoninis DNR taikiny (vidutinio aktyvumo būseną). Autoinhibicinis efektas yra panaikinamas, W228A mutacijos pagalba pašalinus gretimą dimerą.

Bse634I tetramerui surišus du specifinius DNR taikinius, jų karpymas vyksta ne tik greitai, bet ir sutartinai (10 pav. (A)), dėl to reakcijos eiga negali būti aprašyta paprasta nuoseklios reakcijos schema. Tai rodo, kad šiuo atveju keturi Bse634I aktyvūs centrai neveikia nepriklausomai, bet karpant DNR tarp jų vyksta komunikacija (9 pav. (B) ir 10 pav. (A)). Ši komunikacija tarp aktyvių centrų restrikcijos endonukleazėje Bse634I vyksta per pirminių dimerų sąveikos paviršių. Iš tikrųjų, W228A mutantas, kuris negali sudaryti tetramero, DNR karmo nesutartinai (9 pav.).

Taigi, mūsų tyrimai rodo, kad tetramerizacija ne tik stabilizuoja funkciškai svarbų dimerą, bet ir sąlygoja pirminių dimerų komunikaciją, kurios dėka vyksta fermento katalitinio aktyvumo kontrolė. Gali būti, kad tetramerizacija yra reikalinga sinaptiniams fermento ir DNR kompleksams sudaryti ir taip reguliuoti jo katalitinį aktyvumą. Kita vertus, mažas vieną DNR taikinį surišusio tetramero katalitinis aktyvumas yra funkcinio dimero stabilizavimo pasekmė.

2. Alosterinis komunikacijos tinklas tetramerinėje restrikcijos endonukleazėje Bse634I

Kaip parodyta aukščiau, pirminiai dimerai, sudarantys Bse634I tetramerą, DNR hidrolizės metu neveikia nepriklausomai, tačiau komunikuoja vienas su kitu (žr. 1.8). Komunikacinė sąveika, užtikrinanti ryšį tarp pirminių dimerų, turėtų persiduoti per Bse634I tetramerizacijos paviršių. Siekiant nustatyti galimus komunikacijos kelius, einančius per Bse634I pirminių dimerų sąveikos paviršių, mes pakeitėme keletą tetramerizacijoje dalyvaujančių aminorūgščių ir ištyrėme gautų mutantinių baltymų oligomerinę būseną bei katalitines savybes. Atliekant šią mutacinę analizę, buvo tikimasi atrinkti tokius Bse634I mutantus, kurie būtų išsaugoję tetramerinę būseną, tačiau dėl pakitusios komunikacijos tarp pirminių dimerų pasižymėtų kitokiomis kinetinėmis savybėmis negu laukinio tipo fermentas.

2.1. Mutantų konstravimas ir atranka

Struktūrinė analizė rodo, kad Bse634I fermento tetramerizacijoje dalyvauja du monomero regionai (Grazulis ir kiti, 2002). Pirmajam regionui priklauso aminorūgštys R226 ir W228, esančios α 7-spiralės C gale (1 pav. (B)). Antrąjį regioną sudaro trumpa polipeptidinės grandinės atkarpa (260-264 a.r.), priklausanti centrinio lakšto β -klostes jungiančiai kilpai (1 pav. (B)).

Ankstesni tyrimai parodė, kad pirmajam tetramerizacijos regionui priklausančio triptofano W228 pakeitimas alaninu sąlygojo Bse634I tetramero suirimą į dimerus (žr. 1.2.). Šiame etape mes triptofaną W228 pakeitėme kitomis didesnę negu alaninas hidrofobinę šoninę grandinę turinčiomis aminorūgštimis (izoleucinu ir fenilalaninu), tikėdamiesi, kad mutantiniai baltymai išsaugos tetramerinę būseną. Be to, pirmojo regiono arginą R226, kurio šoninės grandinės NE atomas sudaro vandenilinį ryšį su kito pirminio dimero ekvivalentiško arginino pagrindinės grandinės deguonimi, pakeitėme alaninu. Aminorūgštys N262 ir V263 iš antrojo regiono taip pat buvo pakeistos alaninu.

Mutantiniai baltymai buvo ekspresuoti *E. coli* ląstelėse ir išgryninti. Analitinio ultracentrifūgavimo metodu mes ištyrėme mutantų oligomerinę būseną tirpale bei, panaudojant elektroforetinio judrumo poslinkio metodą (žr. "Tyrimų metodiką"), įvertinome, kiek DNR molekulių jie sugeba surišti (žr. 4 lentelę).

4 lentelė. Laukinio tipo Bse634I ir mutantinių baltymų molekulinė masė, oligomerinė būseną bei sąveikos su DNR stochiometrija.

Baltymas	Molekulinė masė (kDa)	Oligomerinė būseną	Surištų DNR molekulių skaičius
wt Bse634I	125	Tetrameras	2
W228A	55	Dimeras	1
R226A	35	Monomeras	1
W228F	76	Dimeras	1
W228I	54	Dimeras	1
N262A	122	Tetrameras	2
V263A	120	Tetrameras	2

Gauti rezultatai rodo, kad tik N262A ir V263A mutantai tirpale yra tetrameriai bei gali sąveikauti su dviem Bse634I atpažinimo sekomis vienu metu. Todėl šie mutantai buvo pasirinkti tolimesniems tyrimams.

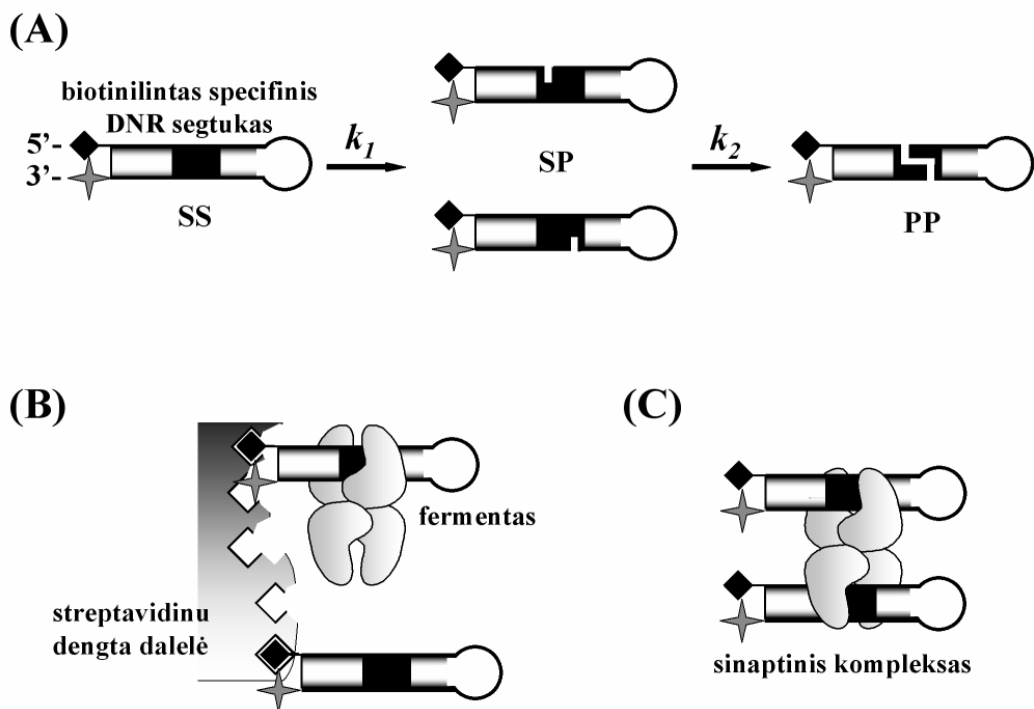
N262A ir V263A mutantų denatūracijos GdmCl eksperimentai parodė, kad jų tetramerų stabilumas yra mažesnis negu laukinio tipo Bse634I, tačiau didesnis negu W228A dimero (duomenys nepateikti) (Zaremba ir kiti, 2006). N262A ir V263A mutacijos neturėjo įtakos baltymo monomero stabilumui.

2.2. Kinetinių savybių tyrimas

Ankstesni kinetiniai tyrimai parodė, kad Bse634I tetramere du pirminiai Bse634I dimerai komunikuoja (žr. 1.8.). Jei abu pirminiai dimerai yra surišę po specifinį DNR taikinį, tai DNR hidrolizė vyksta greitai. Tačiau, jei tik vienas pirminis dimeras sąveikauja su atpažinimo seka, tai antrasis DNR nesurišęs dimeras slopina katalitinį aktyvumą. Siekiant nustatyti N262A ir V263A mutacijų įtaką komunikacinei sąveikai tarp pirminių dimerų, mes ištyrėme šių mutantų katalitinį aktyvumą, fermentui sąveikaujant su viena ir dviem Bse634I atpažinimo sekomis.

Bse634I tetrameras geba sudaryti katalizei palankius sinaptinius kompleksus tiek su dviem specifiniais taikiniiais, tiek su vienu specifiniu ir vienu nekanoniniu taikiniu (žr. 1.6.1.). Dėl šios priežasties kinetinių duomenų interpretacija, naudojant įprastinius vieną ir du taikinius turinčius plazmidinius substratus, Bse634I atveju nėra vienareikšmiška. Stebima DNR hidrolizė vyksta ne tik fermento kompleksuose su vienu ar dviem specifiniais taikiniiais, tačiau ir mišriuose sinaptiniuose kompleksuose su *in cis* esančiais nekanoniniais taikiniiais (žr. 1.5.4.). Aukščiau mes parodėme (žr. 1.6.), kad sintetiniai oligonukleotidiniai DNR dupleksai yra gera alternatyva plazmidiniams DNR substratams. Specifinį oligonukleotidą imobilizavus ant kieto paviršiaus, galima stebėti DNR karpymą fermentui sąveikaujant tik su vienu specifiniu taikiniu. Į tokį reakcijos mišinį papildomai pridėjus neimobilizuoto specifinio DNR duplekso, galima stebėti DNR hidrolizę, vykstančią sinaptiniuose fermento kompleksuose su dviem specifiniais taikiniiais (žr. 1.6.1.). Tačiau, skirtingai nuo plazmidinių substratų, DNR dupleksų atveju negalima tiesioginiai sekti DNR hidrolizės metu susidarančio tarpinio viengrandį trūkį turinčio produkto susidarymo.

Norėdami išvengti minėtų plazmidinių substratų ir DNR dupleksų trūkumų, kinetiniuose tetramerinių mutantų tyrimuose substratu panaudojome specifinį DNR segtuką (toliau **DNR segtukas**) (14 pav. (A)). 30 bp ilgio DNR segtukas buvo gautas sulydant 60 nt ilgio oligonukleotidą (žr. 1 lentelę). DNR segtuko centre esanti Bse634I atpažinimo seka (ACCGGT) yra simetriškai apsupta identiškais 3 bp ilgio DNR sekomis. DNR segtuko 5'-galas turi biotino liekaną, o jo 3'-galas buvo naudojamas radioaktyvios žymės įvedimui. Baltymo ir DNR sąveikos tyrimai sustabdyto elektroforetinio judrumo metodu parodė, kad wt Bse634I šiam DNR segtukui turi tokį patį giminingumą kaip ir anksčiau naudotam 30 bp specifiniam DNR dupleksui 30/30 (žr. 1.4., 1 lentelę, duomenys nepateikti). DNR segtuką, pažymėtą radioaktyviu izotopu 3'-gale, karpant Bse634I, gali susidaryti du radioaktyvūs produktai (14 pav. (A)): "ilgasis" produktas atsiranda įvedus viengrandį trūkį viršutinėje substrato grandinėje, "trumpasis" produktas atsiranda įvedus viengrandį trūkį apatinėje substrato grandinėje arba perkirpus abi DNR grandines. Skirtingai nuo oligonukleotidinio duplekso, DNR segtuko hidrolizės metu galima tiesiogiai stebėti pradinio substrato (SS), tarpinio viengrandį trūkį turinčio produkto (SP) ir galutinio dvigrandį trūkį turinčio reakcijos produkto (PP) koncentracijos pokyčius (Zaremba ir kiti, 2006).



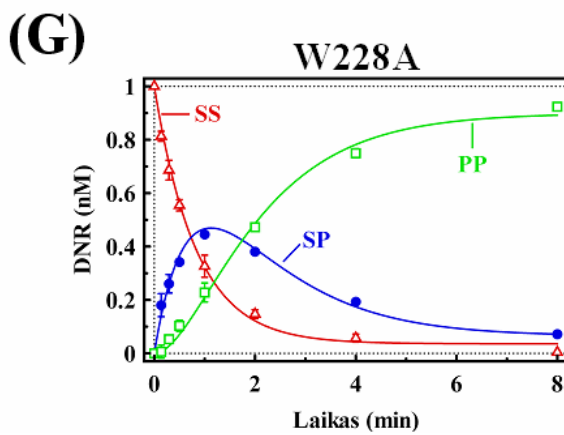
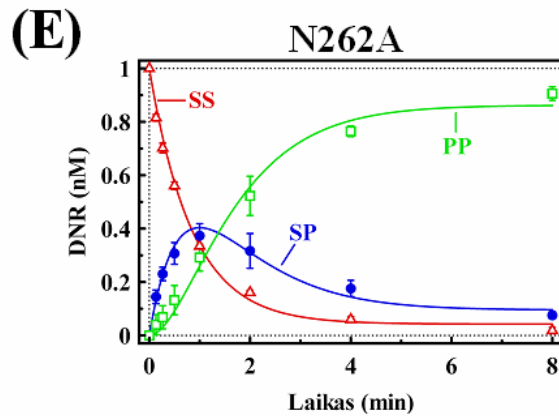
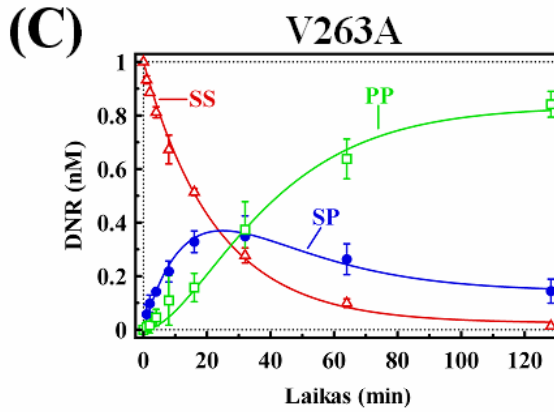
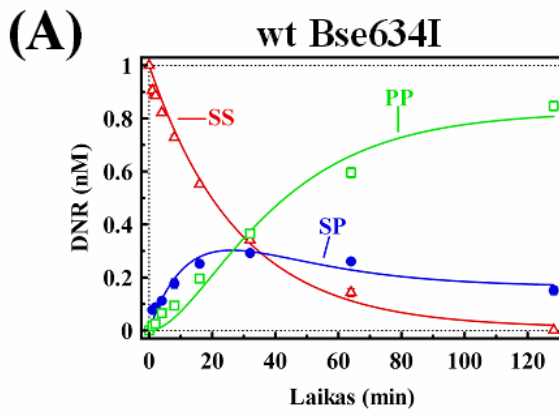
14 pav. *Specifinis DNR segtukas, naudotas kinetiniams bandymams (Zaremba ir kiti, 2006).* (A) DNR segtuko karpymo tetramerine restrikcijos endonukleaze Bse634I schema. Juodas stačiakampis vaizduoja Bse634I atpažinimo seką. Substrato 5'-galas turi biotino liekaną, 3'-galas pažymėtas radioaktyvia žyme. SS forma žymi pradinį substratą, SP yra tarpinis viengrandį trūkį turintis produktas, PP yra galutinis reakcijos produktas su abiem perkirptomis grandinėmis. k_1 ir k_2 atitinkamai yra pirmos ir antros grandinių perkirpimo greičio konstantos. Paveikslėliai (B) ir (C) skiltyse vaizduoja eksperimento strategiją, karpant ant kieto paviršiaus imobilizuotą DNR segtuką ir jį karpant tirpale. (B) DNR segtuko imobilizavimas mažu tankiu ant streptavidinu dengtų dalelių. Mažas imobilizuotos DNR tankis užtikrina, kad fermento tetrameras galėtų sąveikauti tik su viena substrato molekule ir nesudarytų sinaptinių kompleksų su dviem DNR segtuko molekulėmis. (C) Sinaptinių fermento kompleksų su dviem DNR segtuko molekulėmis susidarymas tirpale.

2.2.1. Bse634I sąveika su vienu atpažinimo taikiniu: imobilizuoto DNR segtuko hidrolizė

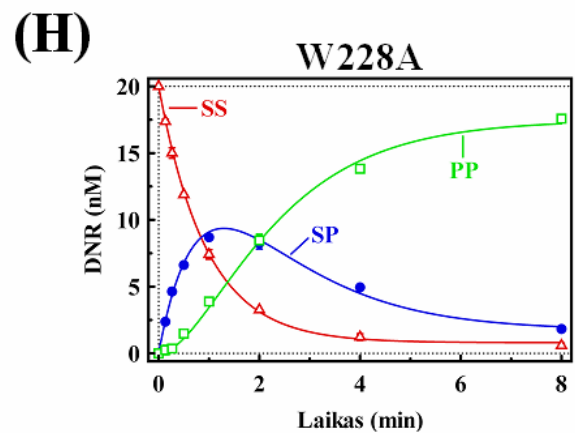
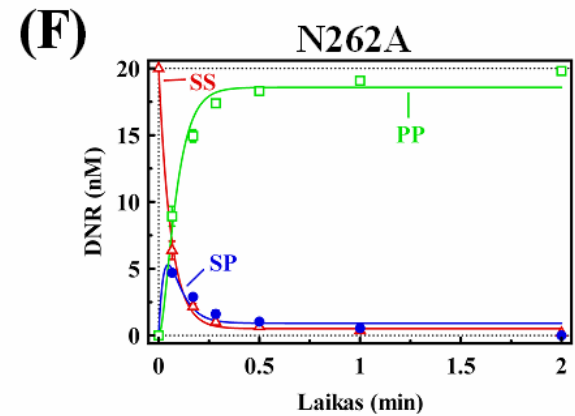
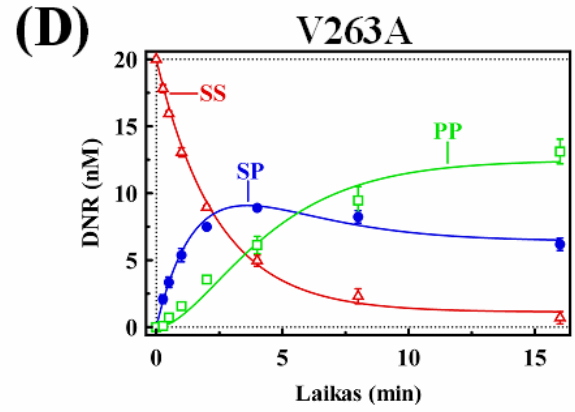
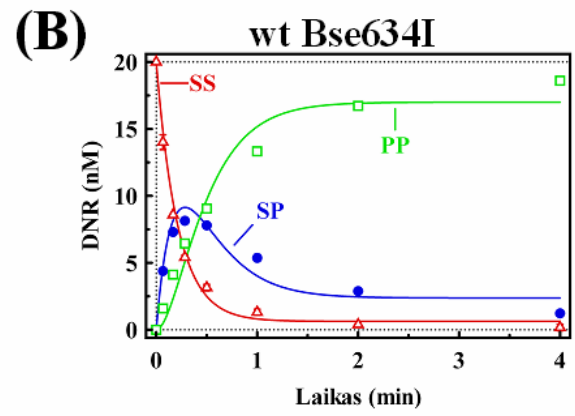
Siekiant įvertinti Bse634I katalitinį aktyvumą, fermentui sąveikaujant tik su viena atpažinimo seka, DNR segtukas buvo mažu tankiu imobilizuotas ant streptavidinu dengtų dalelių paviršiaus (14 pav. (B), žr. 1.6.). Imobilizuotos DNR (~1.0 nM) karpymas vykdytas esant sotinančiai fermento koncentracijai: 250 nM wt Bse634I/N262A/V263A tetramero ir 2500 nM W228A dimero. Tolimesnis fermento koncentracijos didinimas įtakos reakcijos greičiui neturėjo (duomenys nepateikti). Esant tokioms reakcijos sąlygoms, DNR hidrolizės

15 pav. *Specifinio DNR segtuko hidrolizė (Zaremba ir kiti, 2006).* Reakcijos buvo vykdytos kaip aprašyta "Tyrimų metodikoje". (A), (C), (E) ir (G) skiltyse pavaizduota imobilizuoto DNR segtuko hidrolizė esant sotinančiai fermento koncentracijai (250 nM wt Bse634I/V263A/N262A tetramero arba 2500 nM W228A dimero). (B), (D), (F) ir (H) skiltyse pavaizduota DNR segtuko hidrolizė tirpale esant optimaliai fermento koncentracijai, kuri yra palanki tetramerų sinaptinių kompleksų susidarymui (20 nM DNR segtuko, 20 nM wt Bse634I/V263A/N262A tetramero arba 2500 nM W228A dimero). Parodyti pradinio substrato SS (Δ), tarpinio reakcijos produkto su viengrandžiu trūkiumi SP (\bullet) ir galutinio reakcijos produkto su abiem perkirptomis grandinėmis PP (\square) kiekiai. Kinetinės kreivės aprašytos reakcijos schemą (2) atitinkančiais sprendiniais (išstisinės linijos). Gautos optimalios greičio konstantų reikšmės pateiktos 5 lentelėje.

Imobilizuota DNR

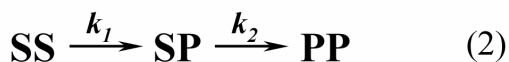


DNR tirpale



15 pav. (Aprašymas priešais)

metu tiek laukinio tipo fermentas, tiek mutantai pradžioje įveda trūkį vienoje iš substrato grandinių, susidarant tarpiniam reakcijos produktui SP, o po to, perkirpę antrąją grandinę, jį paverčia galutiniu produktu PP (15 pav. (A), (C), (E) ir (G)). Tokia reakcijos eiga būdinga įprastoms dimerinėms restrikcijos endonukleazėms (Erskine ir kiti, 1997; Sasnauskas ir kiti, 1999; Terry ir kiti, 1987) ir tetramerinei Bse634I, karpant vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR (žr. 1.5.2.). Imobilizuoto DNR segtuko hidrolizės reakcija kiekybiškai buvo aprašyta remiantis paprasta nuoseklios reakcijos schema:



kur k_1 ir k_2 yra atitinkamai pirmos ir antros DNR grandinių perkirpimo greičio konstantos.

5 lentelė. DNR segtuko ir plazmidinių substratų hidrolizės greičiai.

Fermentas	Vienas DNR taikinyss ^a		Du DNR taikiniai ^b	
	Greičio konstantos ^c		Greičio konstantos ^c	
	$k_1(\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{min}^{-1})$	$k_1(\text{min}^{-1})$	$k_2(\text{min}^{-1})$
	Imobilizuotas DNR segtukas		DNR segtukas tirpale	
wt Bse634I	0.035(± 0.001)	0.057(± 0.005)	4.54(± 0.08)	2.59(± 0.05)
V263A	0.045(± 0.001)	0.066(± 0.003)	0.39(± 0.02)	0.22(± 0.03)
N262A	1.14(± 0.03)	1.13(± 0.01)	16(± 2)	28(± 3)
W228A	1.19(± 0.11)	0.63(± 0.03)	1.02(± 0.01)	0.54(± 0.02)
	Vieną taikinį turinti plazmidinė DNR		Du taikinius turinti plazmidinė DNR	
wt Bse634I	0.061(± 0.008)	0.048(± 0.003)	2.80(± 0.20) ^d	
V263A	0.066(± 0.008)	0.044(± 0.002)	0.71(± 0.02) ^d	
N262A	2.75(± 0.41)	1.30(± 0.13)	6.70(± 0.67) ^d	
W228A	2.56(± 0.35)	0.54(± 0.08)	2.50(± 0.20)	0.56(± 0.04)

^a DNR hidrolizė vykdyta esant sotinamajai fermento koncentracijai, kuriai esant tetrameras gali sąveikauti tik su vienu specifiniu DNR taikiniu.

^b DNR hidrolizė vykdyta esant optimaliai fermento koncentracijai, kuri yra palanki fermento sinaptinių kompleksų su dviem specifiniais taikiniai susidarymui.

^c k_1 ir k_2 yra DNR segtuko ir plazmidinių substratų pirmos ir antros grandinių perkirpimo greičio konstantos.

^d Greičio konstantų reikšmės buvo paskaičiuotos, substrato nykimą aprašant viena eksponente.

Greičio konstantų reikšmės pateiktos 5 lentelėje. Kaip matyti iš gautų duomenų, laukinio tipo fermentas imobilizuotą DNR segtuką karmo žymiai lėčiau negu dimerinis W228A mutantas (žr. 5 lentelę, 15 pav. (A) ir (G)). Tai patvirtina ankstesnius duomenis (žr. 2 lentelę), rodančius, kad wt Bse634I tetramero, sąveikaujančio tik su viena atpažinimo seka, aktyvumas, palyginus su W228A mutantu, yra sumažėjęs (žr. 1.8.). V263A tetrameras imobilizuotą DNR segtuką karmo taip pat lėtai kaip ir laukinio tipo fermentas (žr. 5 lentelę, 15 pav. (A) ir (E)). Šie duomenys rodo, kad V263A mutantui, kaip ir laukinio tipo fermentui, yra būdingas autoinhibicinis efektas. Tuo tarpu N262A mutantas, kuris irgi yra tetrameras, imobilizuotą segtuką karmo apie 30 kartų greičiau negu laukinio tipo fermentas ir savo katalitiniu aktyvumu prilygsta dimeriniam W228A mutantui (žr. 5 lentelę, 15 pav. (A) ir (E)). Tai leidžia manyti, kad N262A mutacija, nesuardydama tetramerinės fermento struktūros, nutraukė tarp pirminių dimerų esančias inhibicines sąveikas.

2.2.2. Bse634I sąveika su dviem atpažinimo taikiniais: DNR segtuko hidrolizė tirpale

Kitame darbo etape mes ištyrėme DNR segtuko hidrolizę tirpale, esant tokioms reakcijos sąlygoms (molinis DNR ir wt Bse634I/N262A/V263A tetramero koncentracijų santykis 1:1), esant kurioms yra stebimas maksimalus katalitinis aktyvumas (15 pav.). Nukrypimas nuo laukiamo teorinio 2:1 DNR segtuko ir Bse634I tetramero santykio galėtų būti paaiškintas netiksliai nustatyta baltymo ir/arba DNR koncentracija. Tai derinasi su pastebėjimu, kad DNR segtuko:Bse634I santykio padidėjimas arba sumažinimas sąlygoja reakcijos greičio sumažėjimą (duomenys nepateikti). Skirtingai negu W228A dimeras, laukinio tipo fermentas ir tetrameriniai N262A bei V263A mutantai tirpale sudaro sinaptinius kompleksus su dviem DNR segtuko molekulėmis. Dimerinis W228A mutantas imobilizuotą DNR segtuką ir segtuką tirpale karmo labai panašiu greičiu (žr. 5 lentelę, 15 pav. (G) ir (H)). Tai patvirtina ankstesnius duomenis, kad šis mutantas suriša tik vieną DNR molekulę ir dėl to vieną ir du taikinius turinčius plazmidinius DNR substratus hidrolizuoja panašiu greičiu (žr. 2 lentelę).

DNR segtuko hidrolizės sinaptiniuose wt Bse634I ir tetramerinių mutantų kompleksuose eksperimentinius duomenis mes kiekybiškai aprašėme remdamiesi schema (2) ir paskaičiavome pirmos ir antros DNR grandinės hidrolizės greičio konstantų k_1 ir k_2 optimalias reikšmes. Šios reikšmės negali būti priskirtos individualių fosfodiesterinių ryšių hidrolizei sinaptiniame fermento komplekse, tačiau leidžia tiesiogiai palyginti DNR karpymo greičius, fermentui sąveikaujant su vienu ir dviem specifiniais taikiniaisi (žr. 5 lentelę).

Sąveikaudamas su viena DNR segtuko molekule, tetramerinis N262A mutantas substratą hidrolizuoja panašiu greičiu kaip W228A dimeras (žr. aukščiau). Tačiau netikėta buvo tai, kad antros DNR segtuko molekulės surišimas sąlygoja DNR hidrolizės greičio padidėjimą. Iš tikrųjų, karpant DNR sinaptiniuose kompleksuose, greičio konstantos k_1 ir k_2 yra atitinkamai 14 ir 25 kartus didesnės negu reakcijoje su imobilizuotu substratu (žr. 5 lentelę, 15 pav. (E) ir (F)). Be to, sinaptiniuose kompleksuose N262A mutantas pirmąją DNR substrato grandinę kerpa 16 kartų greičiau negu dimerinis W228A mutantas ir 4 kartus greičiau negu laukinio tipo fermentas (žr. 5 lentelę). Taigi, N262A mutacija ne tik pašalina autoinhibicines sąveikas, bet sąlygoja papildomą DNR karpymo pagreitėjimą.

Wt Bse634I substratą sinaptiniuose kompleksuose kerpa žymiai greičiau negu nesinaptiniuose. Iš tikrųjų, pirmos ir antros substrato grandinių hidrolizės greičiai sinaptiniuose kompleksuose yra atitinkamai 130 ir 45 kartus didesni negu fermentui surišus tik vieną DNR molekulę ir 4 kartus viršija reakcijos greitį, lyginant su dimeriniu W228A mutantu (žr. 5 lentelę). Jei antros DNR molekulės surišimas Bse634I tetramere tik pašalintų DNR nesurišusio dimero inhibiciją, tai laukiamas DNR hidrolizės greitis sinaptiniuose kompleksuose turėtų būti lygus W228A dimero greičiui. Tačiau, DNR karpant sinaptiniuose wt Bse634I kompleksuose, yra stebimas 4 kartus didesnis reakcijos greitis negu W228A mutanto atveju. Tai leidžia manyti, kad aktyvuojančios sąveikos, būdingos N262A mutantui, veikia ir laukinio tipo fermente. Taigi, antros DNR molekulės surišimas Bse634I tetramere ne tik pašalina DNR nesurišusio dimero inhibiciją, bet papildomai įjungia aktyvuojančias sąveikas, kurios toliau didina reakcijos greitį.

Tetramerinis V263A mutantas yra mažiau jautrus antros DNR molekulės prijungimui: sinaptiniuose kompleksuose pirmos ir antros DNR segtuko grandinių hidrolizės greičiai atitinkamai yra tik 9 ir 3 kartus didesni negu nesinaptiniuose (žr. 5 lentelę, 15 pav. (C) ir (D)). Toks reakcijos greičio išaugimas yra žymiai mažesnis negu laukinio tipo fermento atveju (atitinkamai 130 ir 45 kartai). Be to, net ir sinaptiniuose kompleksuose V263A mutantas DNR segtuką kerpa lėčiau negu dimerinis W228A mutantas (žr. 5 lentelę). Kita vertus, lėtas

imobilizuoto DNR segtuko karpymas rodo, kad šiame mutante tarp pirminių dimerų yra išlikusios autoinhibicinės sąveikos (žr. 5 lentelę). Būtų galima daryti prielaidą, kad V263A mutacija selektyviai susilpnino aktyvuojančias komunikacines sąveikas, kurios persiduoda per fermento tetramerizacijos paviršių ir laukinio tipo fermento bei N262A mutanto atvejais skatina DNR karpymą sinaptiniuose kompleksuose.

Taigi, DNR segtuko hidrolizės tyrimo rezultatai leidžia manyti, kad per Bse634I tetramerizacijos paviršių persiduoda dviejų tipų komunikacinės sąveikos – slopinanti ir aktyvuojanti. Laukinio tipo fermento ir įvairių mutantų atvejais skiriasi šių sąveikų indėliai, todėl jų sinaptiniuose ir nesinaptiniuose kompleksuose yra stebimas skirtingas katalitinis aktyvumas bei DNR hidrolizės reakcijos pobūdis.

2.2.3. Plazmidinės DNR karpymas

Norėdami parodyti, kad DNR segtukas yra tinkama alternatyva plazmidiniams DNR substratams restrikcijos endonukleazių, gebančių sąveikauti su keliais taikiniai, tyrimuose bei gauti galimos papildomos informacijos apie tetramerinius mutantus, mes taip pat ištyrėme DNR karpymą laukinio tipo fermentu ir mutantais, substratu naudojant aukščiau minėtas vieną ir du Bse634I taikinius turinčias plazmides pUCAT1 ir pUCAT2 (žr. 1.5.).

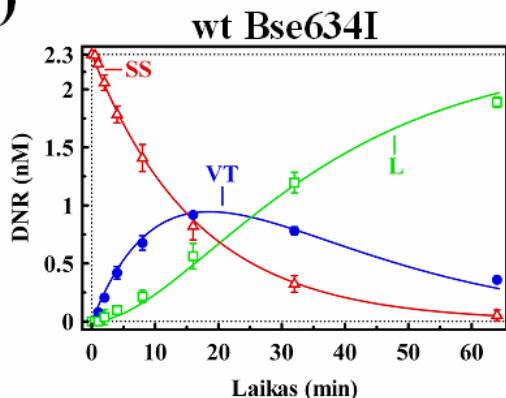
Wt Bse634I ir tetramerinių V263A ir N262A mutantų atvejais vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizės reakcijos eiga, esant sotinančiai fermentų koncentracijai (16 pav. (A), (C) ir (E)), yra beveik identiška reakcijoms su imobilizuotu DNR segtuku (15 pav. (A), (C) ir (E)). Iš tikrųjų, pradžioje perkerpama viena superspiralizuotos (SS) DNR grandinė susidarant tarpiniam produktui (VT), kuris reakcijos eigoje paverčiamas galutiniu reakcijos produktu – linijine (L) DNR su dviem perkirptomis DNR grandinėmis. Kiekybiškai reakcija buvo aprašyta remiantis paprasta nuoseklios reakcijos schema (1) (žr. 1.5.1.) ir paskaičiuotos viengrandžio ir dvigrandžio trūkių įvedimo greičio konstantos k_1 ir k_2 , kurios atitinka imobilizuoto DNR segtuko pirmos ir antros grandinių hidrolizės greičio konstantas (žr. 5 lentelę). Abiejų substratų atveju, reakcijos greičio konstantų k_1 ir k_2 reikšmės yra labai panašios. Tai rodo, kad imobilizuotas DNR segtukas gali būti naudojamas kaip alternatyvus substratas plazmidinei DNR, tiriant tetramerines restrikcijos endonukleazes. Nežymus k_1 reikšmių skirtumas naudojant skirtingus substratus gali būti sąlygotas neigiamos plazmidinio substrato superspiralizacijos: dimeriniu W228A mutantu karpant iš anksto restrikcijos endonukleaze Eco88I linerizuotą pUCAT1 DNR, k_1 reikšmė yra beveik identiška atitinkamai imobilizuoto DNR segtuko konstantos reikšmei (duomenys nepateikti).

Vieną taikinį turinti plazmidė



Sotinanti fermento koncentracija

(A)

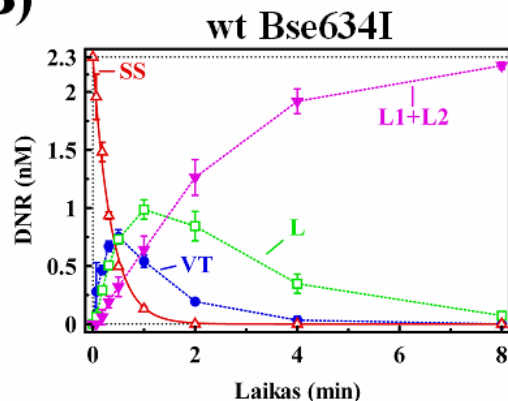


Du taikinius turinti plazmidė

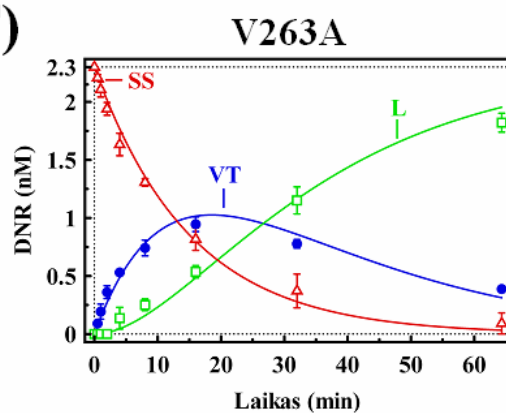


Optimali fermento koncentracija

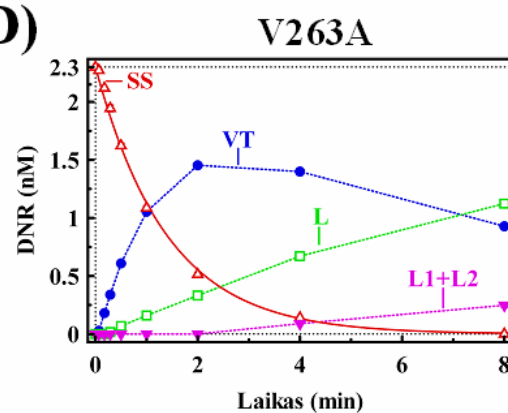
(B)



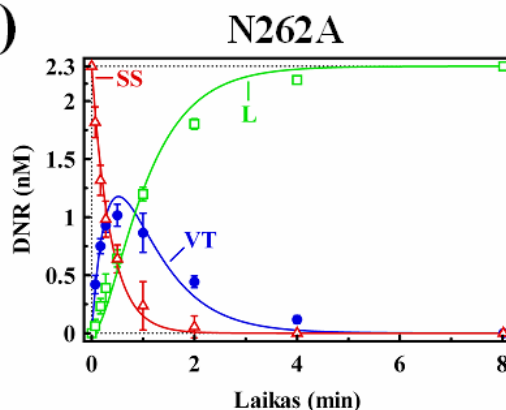
(C)



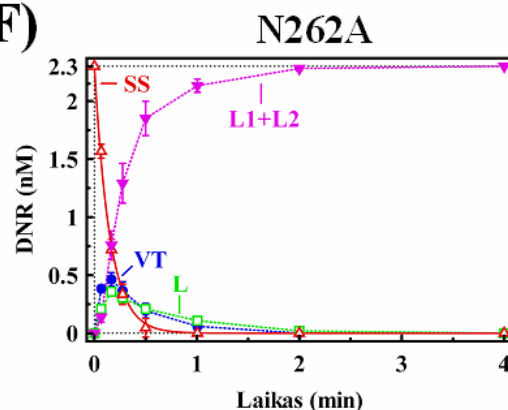
(D)



(E)



(F)



16 pav. Vieną ir du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė (Zaremba ir kiti, 2006). Paveikslėliai virš grafikų iliustruoja įvairias DNR formas, kurios gali susidaryti karpant vieną ir du taikinius turinčią plazmidinę DNR Bse634I fermentu. Du taikinius turinčios plazmidės atveju, VT ir L formos gali turėti papildomus viengrandžius trūkius antrame DNR taikinyje. Reakcijos vykdytos kaip aprašyta "Tyrimų metodikoje". Reakcijos mišiniuose buvo 2.3 nM plazmidinio substrato (vieną (A), (C) ir (E) ir du (B), (D) ir (F) taikinius turinčios plazmidinės DNR). Vieną taikinį turinčio substrato atveju buvo naudota sotinanti fermento koncentracija (250 nM tetramero). Du taikinius turinčios plazmidės atveju buvo naudota optimali fermento koncentracija (25 nM wt Bse634I ir N262A tetramero, 50 nM V263A tetramero). Parodyti superspiralizuotos SS (Δ), žiedinės su viengrandžiu trūkiu VT (\bullet), linijinės L (\square) ir turinčios du dvigrandžius trūkius L1+L2 (\blacktriangledown , tik (B), (D) ir (F) skiltyse) plazmidinės DNR formų kiekiai. Kinetinės kreivės aprašytos vieną eksponentę ((B), (D) ir (F) skiltyse) arba reakcijos schemą (1) ((A), (C) ir (E) skiltyse) atitinkančiais sprendiniais (išstinės linijos). Gautos optimalios greičio konstantų reikšmės pateiktos 5 lentelėje.

Siekiant nustatyti DNR karpymo greičius sinaptiniuose fermentų kompleksuose, du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė vykdyta esant optimalioms fermentų koncentracijoms (25 nM wt Bse634I ir N262A tetramero, 50 nM V263A tetramero), kuriose yra stebimas didžiausias reakcijos greitis. Esant šioms reakcijos sąlygoms, du *in cis* esantys tos pačios plazmidinės DNR molekulės specifiniai taikiniai turėtų būti surišami į sinaptinį fermento kompleksą. Sudėtingi du taikinius turinčios plazmidės karpymo keliai neleidžia atlikti detalios kiekybinės analizės (Nobbs ir kiti, 1998a), todėl mes nustatėme tik tariamą superspiralizuotos DNR formos nykimo greičio konstantą k_{obs} .

Du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizės eiga, karpant ją wt Bse634I, N262A ir V263A mutantais, pateikta 16 pav. (B), (D) ir (F), o atitinkamos reakcijos greičio konstantos k_{obs} pateiktos 5 lentelėje. Viengrandžio trūkio įvedimo į vieną ir du taikinius turinčią plazmidinę DNR greičio konstantų (atitinkamai k_I ir k_{obs}) reikšmių palyginimas parodė, kad DNR karpymas sinaptiniuose wt Bse634I bei tetramerinių N262A ir V263A mutantų kompleksuose pagreitėja, bet skirtingu laipsniu (žr. 5 lentelę). Sinaptiniuose kompleksuose wt Bse634I du taikinius turinčią plazmidinę DNR karmo ~50 kartų greičiau negu vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR. Tuo tarpu V263A ir N262A mutantų atvejais yra stebimas, atitinkamai, tik 10 ir 2 kartų reakcijos pagreitėjimas (žr. 5 lentelę). DNR segtuko hidrolizės tirpale ir pUCAT2 karpymo sinaptiniuose kompleksuose atitinkamos greičio konstantų reikšmės nėra idealiai sutampančios (žr. 5 lentelę). Iš tikrųjų, DNR segtuko hidrolizės tirpale greičiai, karpant jį wt Bse634I ir N262A mutantu, yra atitinkamai 5 ir 16 kartų didesni negu W228A mutanto atveju (žr. 5 lentelę). Tuo tarpu du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizės wt Bse634I fermentu ir W228A mutantu greičiai yra panašūs (žr. 5 lentelę). Viena galimų tokio neatitikimo priežasčių galėtų būti Bse634I gebėjimas sudaryti sinaptinius kompleksus ne tik su dviem specifiniais plazmidinės DNR taikiniais, bet ir su vienu specifiniu ir vienu nekanoniu taikiniais (žr. 1.6.1.). Kadangi katalitinis fermento aktyvumas šiuose kompleksuose yra skirtingas (žr. 1.6.1.), tai du taikinius turinčios plazmidės atveju fermento pasiskirstymas tarp skirtingų sinaptinių kompleksų galėtų nulemti DNR hidrolizės greičio sumažėjimą lyginant su DNR segtuko karpymu tirpale, kai fermentas gali sudaryti sinaptinius kompleksus tik su dviem specifiniais taikiniais.

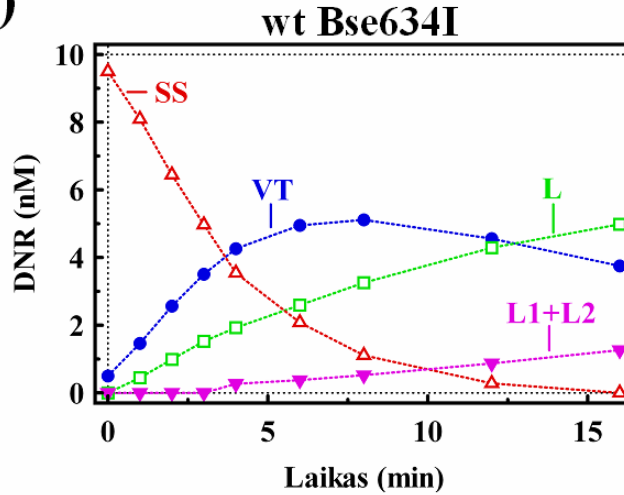
Įdomu tai, kad nors N262A mutantas vieną ir du taikinius turinčius plazmidinius substratus karmo palyginamais greičiais (žr. 5 lentelę), tačiau jų hidrolizės reakcijos eiga ryškiai skiriasi (16 pav. (E) ir (F)). Skirtingai nuo pUCAT1, du taikinius turinčios plazmidės pUCAT2 atveju susidaro žymiai mažesnis viengrandį trūkį turinčio tarpinio produkto kiekis ir pagrindinai daugiausia kaupiasi linijinė DNR, atsirandanti vienu metu perkirpus keturis fosfodiesterinius ryšius abiejose Bse634I atpažinimo sekose (16 pav. (F)). Toks suderintas du taikinius turinčios plazmidinės DNR karpymas leidžia teigti, kad aktyvacinės sąveikos, persiduodančios per tetramerizacijos paviršių, ne tik greitina DNR karpymą sinaptiniuose kompleksuose, bet ir sinchronizuoja keturių individualių fermento aktyvių centrų veikimą. Bandymai su DNR segtuku taip pat rodo labiau suderintą DNR karpymą sinaptiniuose N262A kompleksuose negu nesinaptiniuose: hidrolizuojant DNR segtuką tirpale susidaro mažesnis tarpinio viengrandį trūkį turinčio produkto kiekis lyginant su reakcija ant kieto paviršiaus (15 pav. (E) ir (F)).

Du taikinius turinti plazmidė

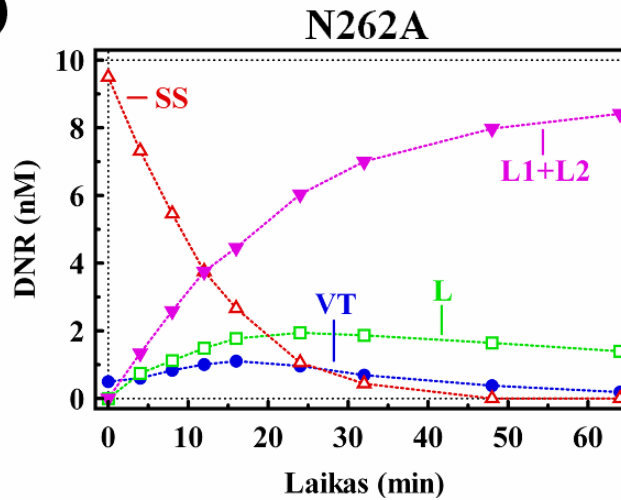


Daugelio apsisukimų sąlygos

(A)



(B)



17 pav. Du taikinius turinčios plazmidinės DNR hidrolizė wt Bse634I (A) ir N262A mutantu (B), esant daugelio apsisukimų sąlygoms (Zaremba ir kiti, 2006). Paveikslėliai virš grafikų iliustruoja įvairias DNR formas, kurios gali susidaryti karpant vieną ir du taikinius turinčią plazmidinę DNR Bse634I fermentu. VT ir L formos gali turėti papildomus viengrandžius trūkius antrame DNR taikinyje. Reakcijos vykdytos kaip aprašyta "Tyrimų metodikoje". Reakcijų mišiniuose buvo 10 nM substrato ir 2 nM laikinio tipo Bse634I tetramero (A) arba N262A tetramero (B). Parodyti superspiralizuotos SS (Δ), žiedinės su viengrandžiu trūkiu VT (\bullet), linijinės L (\square) ir turinčios du dvigrandžius trūkius L1+L2 (\blacktriangledown) plazmidinės DNR formų kiekiai.

Wt Bse634I atveju (16 pav. (B)) reakcijos eigoje viengrandį (VT) arba vieną dvigrandį (L) trūkį turinčios DNR formų kaupimasis rodo, kad fermento aktyvūs centrai veikia ne taip sutartinai kaip N262A mutanto. Ši savybė tampa ypač pastebima, esant daugelio apsisukimų reakcijos sąlygoms, kai yra naudojamas fermento nepriteklus substrato atžvilgiu. Iš tikrųjų, karpant du taikinius turinčią plazmidinę DNR laukinio tipo fermentu, daugiausia kaupiasi žiedinė viengrandį trūkį turinti DNR forma (VT) (17 pav. (A)). Tai rodo, kad fermentas nuo substrato disocijuoja įvedęs viengrandį trūkį vienoje arba abiejose atpažinimo sekose. Skirtingai negu laukinis fermentas, N262A mutantas, esant tokioms pat reakcijos sąlygoms, substratą tiesiogiai paverčia galutiniu reakcijos produktu (L1+L2) (17 pav. (B)). Taigi visus keturis

fosfodiesterinius abiejų taikinių ryšius N262A mutantas perkerpa vieno prisirišimo prie substrato metu.

Plazmidinės DNR karpymo duomenys rodo, kad V263A mutanto atveju aktyvių centrų sinchronizacija yra beveik visiškai išnykusi. Iš tikrųjų, esant visoms išbandytoms reakcijos sąlygoms, DNR segtuko ir plazmidinių substratų hidrolizės metu kaupiasi žymus tarpinio viengrandį trūkį turinčio produkto kiekis (15 pav. (C) ir (D), 16 pav. (C) ir (D)).

2.3. Komunikacinės sąveikos tarp pirminių Bse634I dimerų

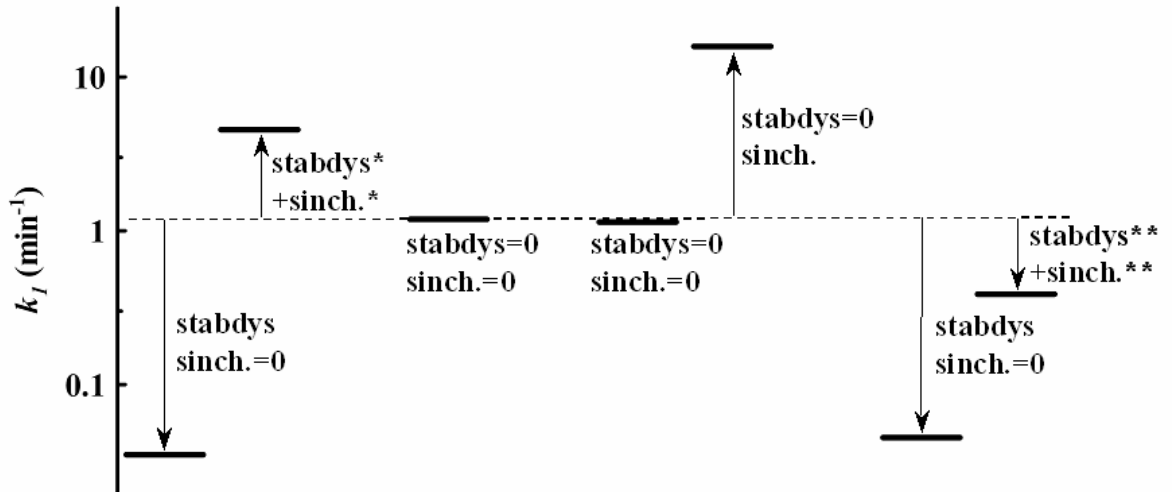
Laukinio tipo Bse634I, dimerinio W228A bei tetramerinių N262A ir V263A mutantų kinetinių savybių tyrimas bei jų palyginimas rodo, kad per tetramerizacijos paviršių tarp pirminių Bse634I dimerų persiduoda slopinantys ir aktyvuojantys komunikaciniai signalai. Slopinanti arba „stabdžio“ sąveika pasireiškia, kai Bse634I tetrameras yra surišęs tik vieną atpažinimo seką. Tada DNR nesurišęs pirminis dimeras sumažina DNR surišusio dimero katalitinį aktyvumą. Antro specifinio DNR taikinio surišimas indukuoja aktyvacines arba „sinchronizacijos“ sąveikas, kurios ne tik greitina DNR karpymą, bet ir koordinuoja keturių aktyvių centrų veikimą Bse634I tetramere.

Mes teigiame, kad skirtingas laukinio tipo fermento, W228A, N262A ir V263A mutantų kinetines savybes sąlygoja skirtingi „stabdžio“ ir „sinchronizacijos“ sąveikų indėliai (18 pav.). Dimerinis W228A mutantas, kuriame visos komunikacinės sąveikos tarp pirminių dimerų yra pašalintos, tarnauja katalitinio aktyvumo atskaitos tašku (18 paveiksle horizontali punktyrinė linija atitinka $k_1 = 1.2 \text{ min}^{-1}$).

Jei laukinio tipo fermentas ar V263A mutantas yra surišęs tik vieną DNR taikinį, dominuoja „stabdžio“ sąveikos. Iš tikrųjų, palyginus su W228A dimeru, jų DNR karpymo greičiai yra 30 kartų mažesni. Šios „stabdžio“ sąveikos yra susilpnintos N262A mutante, kuris vieną surištą DNR taikinį kerpa panašiu į W228A mutanto greičiu (18 pav.).

Antro DNR taikinio surišimas Bse634I tetramere sąlygoja „sinchronizacijos“ komunikacinių sąveikų įjungimą. N262A mutanto atveju, „sinchronizacijos“ sąveikos turbūt yra pagrindinės komunikacinės sąveikos, veikiančios sinaptiniuose fermento kompleksuose. Palyginus su nesinaptiniais kompleksais, jos DNR hidrolizę greitina 15 kartų (18 pav.). Sinaptiniuose wt Bse634I ir V263A mutanto kompleksuose DNR hidrolizė vyksta greičiau negu nesinaptiniuose, tačiau dėl „stabdžio“ sąveikų bendras reakcijos greitis yra mažesnis už N262A mutanto. Iš tikrųjų, DNR karpymas sinaptiniuose wt Bse634I kompleksuose yra tik 4 kartus greitesnis lyginat su W228A mutantu, tuo tarpu V263A mutantas DNR kerpa 3 kartus lėčiau už dimerinį W228A mutantą (žr. 5 lentelę, 18 pav.). Būtų galima manyti, kad DNR hidrolizės greitis sinaptiniuose fermentų kompleksuose priklauso nuo „stabdžio“ ir „sinchronizacijos“ sąveikų santykio. Wt Bse634I atveju, neigiama „stabdžio“ sąveikų įtaka yra panaikinama teigiamos „sinchronizacijos“ sąveikų dėka, ko pasekoje, lyginant su W228A mutantu, yra stebimas 4 kartus didesnis reakcijos greitis. „Sinchronizacijos“ sąveikos yra smarkiai susilpnintos V263A mutante: antros DNR molekulės surišimas reakcijos greitį padidina tik 9 kartus. Susilpnintos „sinchronizacijos“ sąveikos yra nepakankamos atsverti inhibicinės „stabdžio“ sąveikų įtakos. Dėl to DNR hidrolizės greitis yra 3 kartus mažesnis negu W228A mutanto atveju (18 pav.).

Fermentas	wt Bse634I		W228A	N262A		V263A	
Surištų taikinių skaičius	1	2	1	1	2	1	2



18 pav. Viengrandžio trūkio įvedimo į DNR segtuką fermentų sinaptiniuose ir nesinaptiniuose kompleksuose greičio konstantų palyginimas ir skirtingų komunikacijos kelių indėlis (Zaremba ir kiti, 2006). Pateiktos DNR segtuko hidrolizės k_1 greičio konstantų reikšmės, reakciją vykdant ant kieto paviršiaus arba tirpale (5 lentelė). Punktyrinė linija žymi dimerinio W228A mutanto, kuriame yra pašalintos tarp pirminių dimerų esančios komunikacinės sąveikos, aktyvumo lygį. „Stabdžio“ ir „sinchronizacijos“ sąveikų įtaka laukinio tipo fermento ir tetramerinių mutantų DNR karpymui pavaizduota rodyklėmis (žr. 2.3.). „Stabdžio“ ir „sinchronizacijos“ sąveikos sinaptiniuose wt Bse634I (*) ir V263A mutanto (**) kompleksuose veikia kartu, tačiau jų indėliai gali skirtis.

Skirtingi alosterinės aktyvacijos ir inhibicijos signalų perdavimo keliai buvo nustatyti mielių *Saccharomyces cerevisiae* chorizmato mutazėje (Schmidheini ir kiti, 1990; Schnappauf ir kiti, 1998). *E. coli* aspartato karbamoiltransferazėje kryptingos mutagenezės metodu pakeitus kai kurias amino rūgštis, pavyko atskirti aktyvacijos ir inhibicijos signalus (Corder ir Wild, 1989; Zhang ir Kantrowitz, 1989). Iš tikrųjų, fermento inhibicija CTP ir minimali aktyvacija ATP yra stebima K56A mutanto atveju (Corder ir Wild, 1989). Tuo tarpu, K60 pakeitus alaninu, fermentas yra aktyvuojamas ATP, tačiau nežymiai inhibuojamas CTP (Zhang ir Kantrowitz, 1989).

Skirtingus gretimų Bse634I aminorūgščių N262 ir V263 mutantų fenotipus galėtų nulemti skirtingi šių aminorūgščių kontaktai pirminių dimerų sąveikos paviršiuje. Iš tikrųjų, valinas V263, esantis antrajam tetramerizacijos regionui priklausančioje kilpoje, kontaktuoja su $\alpha 7$ spiralės aminorūgštėmis iš pirmojo regiono. Reikia pažymėti, kad šioje spiralėje yra išsidėsčiusi viena iš aktyvaus centro karboksilo liekanų (1 pav. (B)). Tuo tarpu N262 liekana sudaro kontaktą su savo atitikmeniu, esančiu kito monomero antrajame regione. Skirtingas struktūrinis aminorūgščių N262 ir V263 kontekstas gali lemti skirtingus komunikacijos kelius bei fenotipus.

IŠVADOS

1. IIF tipo restrikcijos endonukleazė Bse634I yra tetrameras, kurio optimalus katalitinis aktyvumas pasireiškia fermentui sąveikaujant su dviem atpažinimo sekomis. Mes pademonstravome, kad Bse634I sudaro katalizei palankius sinaptinius kompleksus surišant ne tik dvi specifinės DNR molekules, bet ir specifinės DNR ir reakcijos produkto bei specifinės ir nekanoninės DNR molekules, tačiau visais atvejais DNR yra kerpama tik specifiniame taikinyje.
2. Restrikcijos endonukleazės Bse634I tetramero katalitinis aktyvumas, hidrolizuojant vieną taikinį turinčią DNR, yra sumažintas (autoinhibuotas) dėl komunikacinių sąveikų, egzistuojančių tarp pirminių Bse634I dimerų. Mes parodėme, kad viena mutacija tetramerizacijos paviršiuje suardo Bse634I tetramerą į dimerus ir pašalina autoinhibiciją. Dimerinė forma pasižymi panašiu katalitiniu aktyvumu, karpant vieną ir du taikinius turinčią DNR, tačiau yra mažiau stabili už laukinio tipo Bse634I tetramerą. Taigi, tetramerizacija yra būtina funkciškai svarbaus Bse634I dimero stabilizacijai.
3. Mutacinės analizės pagalba nustatytas alosterinis komunikacijos tinklas, esantis pirminių Bse634I dimerų sąveikos paviršiuje. Identifikuoti dviejų tipų komunikacijos signalai, persiduodantys per Bse634I tetramerizacijos paviršių: inhibicinis arba „stabdžio“ ir aktyvuojantis arba „synchronizacijos“ signalas. Šių signalų sąveika nulemia laukinio tipo ir mutantinių fermentų katalitinių ir reguliacinių savybių skirtumus.
4. Specifinis DNR segtukas pasiūlytas kaip alternatyva plazmidiniams DNR substratams, tiriant restrikcijos endonukleazes, gebančias sąveikauti su keliais DNR taikiniams.

CONCLUSIONS

1. Type IIF restriction endonuclease Bse634I is a tetramer and requires binding of two copies of the recognition sequence to achieve its optimal catalytic activity. We demonstrate that Bse634I also forms catalytically competent synaptic complexes containing cognate DNA-product DNA and cognate DNA-miscognate DNA, however, cleavage occurs only at the cognate site.
2. Cleavage activity of the Bse634I tetramer on a single-site DNA is down-regulated (autoinhibited) due to the cross-talking interactions between the individual dimers. We show that a single mutation at the tetramerisation interface disrupts tetrameric Bse634I into the dimer and relieves the autoinhibition. The dimeric form displays similar activity on the one- and two-site DNA, however, it is less stable in comparison to the wild type Bse634I tetramer. Tetramerisation, therefore, is important for the stabilisation of the functionally obligatory dimer of Bse634I.
3. Allosteric communication network at the dimer-dimer interface of Bse634I has been identified through the mutational analysis. Two types of communication signals propagated through the dimer-dimer interface in the Bse634I tetramer have been identified: the inhibitory, or “stopper” and the activating, or “sync” signal. The interplay between the two signals determines the differences in catalytic and regulatory properties of the wild type and mutant proteins.
4. The hairpin oligonucleotides are suggested as a relevant alternative for plasmid DNA in the mechanistic studies of the restriction enzymes capable to interact with multiple sites.

PADĖKA

Ši disertacija buvo parengta 2001-2006 m. Biotechnologijos institute. Už finansinę paramą esu dėkingas Wellcome Trust, Howard Hughes Medical Institute, International Quality Network ir Lietuvos Valstybiniam Mokslo ir Studijų Fondui.

Dėkoju darbo vadovui prof. dr. Virginijai Šikšniui už nuoseklų vadovavimą, diskusijas, pasiūlymus ir pagalbą rengiant šią disertaciją bei turistines išvykas.

Taip pat dėkoju dr. Giedriui Sasnauskui (Biotechnologijos institutas) už kinetinę analizę, plazmidinius substratus, vertingas diskusijas ir pasiūlymus.

Dėkoju magistrinio darbo vadovui dr. Remigijui Skirgailai (UAB „Fermentas“) už pirmuosius darbo įgūdžius, taip pat už W228A mutantą ir pUC0 plazmidę.

Dėkoju prof. dr. Claus Urbanke (Hanoverio Aukštoji Medicinos Mokykla) už analitinio ultracentrifūgavimo eksperimentus. Taip pat esu dėkingas prof. dr. Alfred Pingoud ir dr. Wolfgang Wende (Gyseno Justus-Liebig Universitetas) už pagalbą ir patarimus atliekant CD eksperimentus.

Norėčiau išreikšti savo padėką žmonėms, kurių darbas leido man atlikti detalius Bse634I tyrimus: prof. dr. Vladimir Repin (Valstybinis Virusologijos ir Biotechnologijos Tyrimų Centras „Vector“) už kamieną su Bse634I restrikcijos-modifikacijos sistema; dr. Renatai Rimšelienei (UAB „Fermentas“) už Bse634I restrikcijos-modifikacijos sistemos klonavimą; dr. Sauliui Gražuliui (Biotechnologijos institutas) už kristalinę Bse634I struktūrą. Dėkoju dr. Arvydui Lubiui (UAB „Fermentas“) už pHpaIIM plazmidę.

Norėčiau padėkoti Giedrei Tamulaitienei (Biotechnologijos institutas) už struktūrinius palyginius bei pastabas ruošiant disertaciją ir visiems kolegoms už diskusijas, komentarus ir pasiūlymus.

Dėkoju UAB „Fermentas“ už molekulinės biologijos produktus ir galimybę pasinaudoti laboratorine įranga.

Dėkoju savo draugams už rūpestį ir palaikymą.

Ypač esu dėkingas savo šeimai už begalinę paramą ir supratimą.

PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

Su disertacijoje pateikta medžiaga susijusios publikacijos:

1. **M. Zaremba**, G. Sasnauskas, C. Urbanke, V. Siksnys (2005). “Conversion of the tetrameric restriction endonuclease Bse634I into a dimer: oligomeric structure-stability-function correlations.” *J Mol Biol* **348** (2), 459-478.
2. **M. Zaremba**, G. Sasnauskas, C. Urbanke, V. Siksnys (2006). “Allosteric communication network in the tetrameric restriction endonuclease Bse634I.” *J Mol Biol*, *priimta*.

Kitos publikacijos:

3. **M. Zaremba**, C. Urbanke, SE. Halford, V. Siksnys (2004). “Generation of the Bfil restriction endonuclease from the fusion of a DNA recognition domain to a non-specific nuclease from the phospholipase D superfamily.” *J Mol Biol* **336** (1), 81-92.

DUOMENYS APIE AUTORIŲ

Mindaugas Zaremba gimė 1977 m. rugpjūčio 18 d. Vilniuje.

1995-2001 m. studijavo Vilniaus universitete Chemijos fakultete biochemijos specialybę. Nuo 1997 m. pradėjo dirbti Biotechnologijos institute, Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimo laboratorijoje. Čia vadovaujamas prof. dr. V. Šikšnio parengė baigiamąjį darbą „Restrikcijos endonukleazės *Cfr10I* DNR sekos atpažinimo rajono mutacinė analizė“, kurį apgynė 1999 m., ir diplominį darbą „Restrikcijos endonukleazės *Cfr10I* sąveikos su DNR determinančių mutacinė analizė“, kurį apgynė 2001 m..

Nuo 2001 m. iki 2005 m. M. Zaremba studijavo biochemijos (04 P) krypties baltymų ir enzimologijos (P310) šakos doktorantūroje Biotechnologijos institute. Studijų tema – „Tetramerinių restrikcijos endonukleazių komunikacijos mechanizmo tyrimai“. Darbo vadovas – prof. dr. V. Šikšnys.

Pagrindinės M. Zarembos mokslinių interesų kryptys – baltymų-DNR sąveikos mechanizmai bei restrikcijos endonukleazių struktūros ir funkcijos ryšys.

SUMMARY

The orthodox Type IIP restriction endonucleases (REases) are homodimers that recognise palindromic sequences of 4-8 bp in length, and cleave DNA within this sequence in both strands (Pingoud et al., 2005). These enzymes act on the individual copies of their recognition sites. Type IIP dimers symmetrically bind their palindromic target sequence positioning active site of each subunit against scissile DNA strand. Action of both active sites in the dimer generates the double-strand break. The Type IIF REases mostly are homotetramers arranged as a dimer of dimers (Deibert et al., 2000; Grazulis et al., 2002; Siksnys et al., 1999; Vanamee et al., 2005). Each primary dimer resembles a dimeric orthodox REase that contains a single cleft for DNA binding. Therefore, tetrameric REases can simultaneously interact with two DNA copies. In fact, these enzymes require binding of two copies of their recognition sequence for the optimal catalysis, whereas binding of only single copy of cognate DNA results in a very low activity (Bilcock and Halford, 1999; Deibert et al., 2000; Siksnys et al., 1999; Wentzell et al., 1995). Moreover, cleavage of two bound DNA molecules by the tetrameric REases proceeds in concerted manner: all four phosphodiester bonds at both recognition sites are cleaved in unison. Such cleavage pattern suggests that cross-talking interactions between primary dimers coordinate the action of four catalytic centers in the tetramer during catalysis. However, the detailed mechanism of communication between the primary dimers in the tetrameric REases remains unknown.

We have focused our efforts on elucidation of the mechanisms of communication and cleavage by the tetrameric restriction enzyme Bse634I. It recognises the degenerate hexanucleotide sequence R↓CCGGY and cleaves both DNA strands after the first nucleotide (cleavage position indicated by “↓”) (Repin et al., 1995). Similar to other Type IIF REases, Bse634I is arranged as a dimer of dimers and cleaves DNA substrate with two sites much faster than the single-site DNA (Grazulis et al., 2002). Bse634I belongs to a large evolutionarily related family of Type II restriction enzymes that recognise related DNA sequences and possess the conserved cleavage position within recognition site (Bujnicki, 2004; Pingoud et al., 2002; Tamulaitis et al., 2002). The family members have a conserved structural core of the monomer (Bochtler et al., 2006; Siksnys et al., 2004; Zhou et al., 2004); however, they exhibit variability in quaternary structure. Indeed, Bse634I, together with NgoMIV and Cfr10I are homotetramers (Siksnys et al., 2004), PspGI, Ecl18kI, EcoRII are homodimers (Pingoud et al., 2003; Reuter et al., 1998; Tamulaitis et al., 2002), while SgrAI is a homodimer in solution; however, it associates transiently to build a tetramer upon DNA binding (Daniels et al., 2003). Understanding the oligomeric structure-function relationships within the family of the homologous restriction enzymes can provide clues to the biological and functional significance of different quaternary associations.

In order to determine the role of oligomeric structure in the function of the restriction endonuclease Bse634I, we disrupted the tetramer into the dimers generating the W228A mutant. The dimeric variant of Bse634I similarly to the orthodox Type IIP enzymes showed equal catalytic activity on the plasmid DNA containing a single and two recognition sites. Stability studies, however, demonstrated that the dimeric form of Bse634I is less resistant to the chemical denaturants, thermal inactivation and protease treatment compared to the tetrameric wt Bse634I protein. The stability of the Bse634I monomer, on the other hand, is not compromised. Thus, taken together the experimental results suggest that tetramerisation of REases might be employed for stabilisation of functionally important dimer.

We have shown by gel-shift and kinetic analysis using both plasmid DNA and oligonucleotide substrates that tetrameric restriction endonuclease Bse634I is able to bind two copies of the recognition sequence resulting in the optimal catalytic activity. We provided experimental evidence that Bse634I also forms catalytically competent synaptic complexes containing cognate DNA-product DNA and cognate DNA-miscognate DNA. In mixed synaptic complex with one cognate and one miscognate DNA, cleavage occurs only at the cognate site. Whereas binding of the single cognate DNA molecule by Bse634I tetramer results in low residual catalytic activity. In contrast to the wt enzyme, dimeric W228A variant binds only single copy of the recognition sequence, however, cleaves it with a high efficiency. The second copy of the recognition sequence does not stimulate the cognate DNA cleavage by dimeric W228A mutant. Thus, a single W228A mutation converted a Type IIF tetrameric restriction endonuclease Bse634I that requires two copies DNA for the optimal cleavage into a dimeric Type IIP endonuclease that effectively cleaves a single copy of the cognate DNA. Stability studies, however, demonstrated that the dimeric form of Bse634I is less resistant to the chemical denaturants, thermal inactivation and protease treatment compared to the tetrameric wt Bse634I protein. The stability of the Bse634I monomer, on the other hand, is not compromised. Thus, taken together the experimental results suggest that tetramerisation of REases might be employed for stabilisation of functionally important dimer.

To identify communication pathways involved in the catalytic activity regulation of Bse634I tetramer we mutated a selected set of amino acid residues at the dimer-dimer interface and analysed the oligomeric state and catalytic properties of the mutant proteins. We demonstrated that alanine replacement of N262 and V263 residues located in the loop at the tetramerisation interface did not inhibit tetramer assembly but dramatically altered the catalytic properties of Bse634I despite of the distal location from the active site. Kinetic analysis using cognate hairpin oligonucleotide and one- and two-site plasmids as substrates allowed us to identify two types of communication signals propagated through the dimer-dimer interface in the Bse634I tetramer: the inhibitory, or “stopper” and the activating, or “sync” signal. The “stopper” interactions manifest when Bse634I tetramer interacts with a single copy of cognate DNA resulting in the down-regulation of the catalytic activity of the DNA-bound primary dimer by the DNA-free dimer. Binding of the second DNA copy induces stimulatory or “sync” interactions that both accelerate DNA cleavage and synchronise the action of four active sites within Bse634I tetramer resulting in the concerted DNA cleavage. We suggest that the interplay between the two signals determines the catalytic and regulatory properties of the Bse634I and mutant proteins.

Finally, we have demonstrated that cognate oligonucleotide hairpin provides a relevant alternative for plasmid DNA in the mechanistic studies of the restriction enzymes capable to interact with multiple sites.

