

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Dmitrij Golovenko

**RESTRIKCIJOS ENDONUKLEAZIŲ EcoRII, BfiI IR
Bse634I STRUKTŪRINIAI IR FUNKCINIAI TYRIMAI**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2012

Disertacija parengta Vilniaus Universiteto Biotechnologijos institute 2004-2012 metais.

Moksliniai konsultantai:

Dr. **Saulius Gražulis** (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, chemija - 03 P)

Prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Disertacija ginama Vilniaus Universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje

Pirmininkas:

Prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Nariai:

Prof. habil. dr. **Kęstutis Sasnauskas** (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. dr. **Zippora Shaked** (Weizmann Institute of Science, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Prof. dr. **Arvydas Lubys** (Thermo Fisher Scientific, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Dr. **Arūnas Lagunavičius** (Thermo Fisher Scientific, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Oponentai:

Dr. **Česlovas Venclovas** (Vilniaus Universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Dr. **Eglė Merkienė** (Thermo Fisher Scientific, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2012 m. lapkričio 6 d. 10 val. Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto konferencijų salėje. Adresas: V. Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2012 m. spalio 5 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto ir Vilniaus Universiteto bibliotekose.

VILNIUS UNIVERSITY

Dmitrij Golovenko

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF
RESTRICTION ENDONUCLEASES EcoRII, BfiI AND
Bse634I**

Summary of doctoral dissertation
Physical sciences, biochemistry (04 P)

Vilnius, 2012

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University during 2004-2012.

Scientific consultants:

Dr. **Saulius Gražulis** (Vilnius University, physical sciences, chemistry - 03 P)

Prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Evaluation board of the doctoral thesis of Biochemistry trend

Chairman

Prof. habil. dr. **Saulius Klimašauskas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Reviewers

Prof. habil. dr. **Kęstutis Sasnauskas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. dr. **Zippora Shaked** (Weizmann Institute of Science, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. dr. **Arvydas Lubys** (Thermo Fisher Scientific, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Dr. **Arūnas Lagunavičius** (Thermo Fisher Scientific, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Opponents

Dr. **Česlovas Venclovas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Dr. **Eglė Merkienė** (Thermo Fisher Scientific, physical sciences, biochemistry - 04 P)

The thesis defense will take place at the Institute of Biotechnology, Vilnius University (V. Graičiūno 8, Vilnius, LT-02241, Lithuania) on 6th of November, 2012, at 10 a.m.

The summary of the thesis was sent on 5th of October, 2012.

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

TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS.....	6
ĮVADAS.....	7
TYRIMŲ METODIKA.....	11
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	17
1. EcoRII-C domeno sąveikos su DNR tyrimai.....	17
1.1. Struktūroje DNR oligodupleksas surištas dviejose orientacijose.....	17
1.2. Bendra EcoRII-C domeno struktūra su DNR.....	17
1.3. EcoRII-C taikinyje CCWGG išsuka centrinius nukleotidus	18
1.4. EcoRII-C galimas centrinių T/A atpažinimo mechanizmas.....	19
1.5. EcoRII-C sąveika su taikinio CCWGG simetrine dalimi CC:GG.....	20
1.6. EcoRII-C aktyvus centras.....	21
1.7. EcoRII-C jautrumas substrato metiliniui.....	22
2. EcoRII-N domeno sąveikos su DNR tyrimai.....	23
2.1. EcoRII-N domeno struktūra su DNR.....	23
2.2. EcoRII-N taikinio CCTGG atpažinimo mechanizmas.....	24
2.3. Specifinių kontaktų su taikinio centrine T:A bazių pora tyrimas	26
2.4. EcoRII-N jautrumo metiliniui bei ir netiesioginio atpažinimo tyrimai.....	27
2.5. Panašumas į kitus B3 sanklodos baltymus.....	28
3. EcoRII veikimo modelis.....	30
4. BfiI domenų sąveikos su DNR tyrimai.....	31
4.1. BfiI N- ir C-galinių domenų kristalinimas su DNR.....	31
4.2. BfiI-C sąveikos su specifine DNR mechanizmas.....	32
5. Bse634I sąveikos su DNR tyrimai.....	36
5.1. Bse634I-R226A kristalinimas su DNR, komplekso sandara.....	36
5.2. Bse634I aktyvus centras.....	38
5.3. Bse634I taikinio atpažinimas.....	38
5.4. Bse634I DNR surišimo ir karpymo eksperimentai.....	40
IŠVADOS.....	43
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS.....	44
CURRICULUM VITAE.....	45
PADĖKA.....	46
SUMMARY.....	47
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	48

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

a.r.	aminorūgštis
apo	žymi baltymo formą, kai baltymas nėra surišęs DNR
bp	bazių pora
CPK	atomų spalvinimo schema pagal Corey, Pauling, Koltun (C=pilka; O=raudona; N=mėlyna; S=geltona, P=oranžinė)
DTT	1,4-ditiotreitolis
EDTA	etilendiaminotetraacto rūgštis
JSA	jaučio serumo albuminas
NDS	natrio dodecilsulfatas
PAAG	poliakrilamidinis gelis
PAGE	poliakrilamidinio gelio elektroforezė
PEG	polietilenglikolis
PDB ID	struktūros unikalus identifikacijos numeris PDB duombazėje
REazė	restrikcijos endonukleazė
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

Tekste naudojami standartiniai aminorūgščių pavadinimų trijų raidžių sutrumpinimai laukinio tipo baltymo atveju bei vienos raidės sutrumpinimai taškinių mutacijų žymėjimui. DNR sekose „W“ žymi adeniną arba timiną, „Y“ žymi pirimidiną, „R“ žymi puriną, „M“ ir „5mC“ žymi 5-metilcitoziną, „N“ žymi poziciją, kurioje gali būti bet kuris iš keturių A, G, T arba C nukleotidų.

IVADAS

Restrikcijos endonukleazės (REazės) plačiai paplito bakterijų bei archėjų karalystėse kaip sudedamoji restrikcijos-modifikacijos sistemų dalis [1]. Šios sistemos apsaugo prokariotines ląsteles *in vivo* nuo svetimų DNR (pvz. bakteriofago) invazijos. II-o tipo REazės atpažįsta trumpas, dažniausiai 4-8 bazių porų (bp) ilgio DNR sekas ir kerpa abi taikinio grandines atpažinimo sekoje arba šalia jos, susidarant lipniems arba bukiems galams [2]. Šiuo metu yra žinoma virš 4000 REazių, kurios atpažįsta per 300 skirtingų sekų [3]. Taigi REazės sudaro vieną didžiausių funkciškai panašių baltymų šeimų. Kristalografiniai bei bioinformatiniai tyrimai išskirsto REazės pagal katalizinio domeno struktūrą į vieną iš penkių struktūrinių sanklodų (*angl.* fold). II tipo REazės yra skirstomos į i) PD-(D/E)XK superšeimą, ii) fosfolipazių D (PLD) superšeimą, iii) „perpjauto cilindro“ (*angl.* „half-pipe“) superšeimą, iv) GIY-YIG superšeimą ir v) $\beta\beta\alpha$ -Me (HNH) superšeimą [4]. Kristalografiniai tyrinėjimai suteikia galimybę geriau pažinti, kaip įvairios baltymų struktūrinės sanklodos yra pritaikytos atlikti REazių funkciją bei įgalina pritaikyti homologinio modeliavimo metodą, tiriant tos pačios šeimos REazes.

Daugiausiai informacijos apie restrikcijos fermentų struktūros-funkcijos ryšį gauta iš PD-(D/E)XK superšeimoms tyrinėjimų. Yra žinomos 34 priklausančių šiai superšeimai REazių struktūros [5]. Struktūrų sugretinimas leido identifikuoti superšeimai būdingą struktūrinę sanklodą, kurioje išsidėsto dvi arba trys neigiamai įkrautos aktyvaus centro aminorūgštys (Asp arba Glu) bei viena teigiamai įkrauta aminorūgštis (Lys) [6]. Konservatyvi PD-(D/E)XK struktūrinė šerdis skirtinguose šeimos atstovuose yra papildyta įvairiais struktūriniais elementais, įskaitant DNR surišančius domenų, kurie dažnai apsprendžia specifiškumą sekai [7]. Ženkliai mažiau struktūrinės informacijos apie REazės iš kitų superšeimų. Pavyzdžiui, prieš pradėdant šį disertacinį darbą nebuvo kristalografiais metodais ištirta, kaip PLD superšeimoms REazės atpažįsta DNR.

Disertacijoje pristatomo darbo tikslas – kristalografiais bei biocheminiais metodais iširti specifiškumo-struktūros sąryšį PD-(D/E)XK ir fosfolipazių D superšeimoms priklausančioms restrikcijos fermentams. Savo darbo objektais pasirinkome PD-(D/E)XK superšeimoms Cfr10I/NgoMIV/Bse634I pogrupiui priklausančias REazes Bse634I ir EcoRII bei PLD superšeimoms fermentą BfiI.

REazių šeima Cfr10I/NgoMIV/Bse634I. Šiai grupei priklausančios REazės atpažįsta konservatyvius sekas, kuriuose yra centriniai CCGG arba CCNGG nukleotidai, kurie gali turėti skirtingą apsuptį [8]. Šios grupės REazės skelia fosfodiesterinį ryšį prieš pirmą citoziną iš centrinės CCGG sekos (1 lentelė). Šiuo metu grupę sudaro 12 fermentų, kurie atpažįsta skirtingas 4-8 bp ilgio sekas. Nepaisant konservatyvios monomero struktūros, grupės fermentai skiriasi savo ketvirtine struktūra bei specifiškumu sekai. Būtent struktūriniai tyrinėjimai gali padėti suprasti, kaip skirtingi specifiškumai išsivysto bendroje baltymo šerdyje. Oligomero struktūros-funkcijos sąryšis homologiškų baltymų grupėje gali taip pat atskleisti fermentų ketvirtinės struktūros biologinę ir funkcinę svarbą.

Tetramerinė IIF tipo REazė Bse634I yra viena iš pirmųjų šio pogrupio atrastų atstovų, ji atpažįsta „išsigimusią“ heksanukleotidinę seką R↓CCGGY (rodyklė „↓“ žymi

skėlimo vieta) [9]. Bse634I erdvinė struktūra yra nustatyta 2002 m., bet iki šio disertacinio darbo pradžios nebuvo žinoma, koks yra detalus sekos atpažinimo mechanizmas, nes fermento struktūra su DNR nebuvo žinoma.

1 lentelė. Restrikcijos fermentų, savo atpažinimo sekoje turinčių konservatyvų CCGG motyvą, šeima

Fermentas	Tipas	Atpažinimo seka	Oligomerinė būsena su DNR	Funkciniai reikalavimai	
HpyF100III	IIP	↓CCGG	n.d.*		[10]
AgeI	IIP	A↓CCGGT	n.d.		[11]
Kpn2I	IIP	T↓CCGGA	n.d.		[12]
NgoMIV	IIF	G↓CCGGC	tetrameras	Du taikiniai	[13]
BsaWI	IIP	W↓CCGGW	n.d.		[3]
Cfr10I /Bse634I	IIF	R↓CCGGY	tetrameras	Du taikiniai	[14][15]
SgrAI	IIF	CR↓CCGGYG	tetrameras	Du taikiniai	[16]
PspGI	IIP	↓CCWGG	dimeras		[17]
EcoRII	IIE	↓CCWGG	dimeras	Du taikiniai	[18][19]
Ecl18kI	IIF	↓CCNGG	tetrameras	Du taikiniai	[20][10]
PfoI	IIP	T↓CCNGGA	n.d.		[21]

* n.d. - nėra duomenų.

REazė EcoRII atpažįsta 5'-CCWGG seką. Šios REazės taikinytis yra simetriškas, išskyrus centrinę bazių porą. EcoRII yra viena iš IIE tipo REazių, kurios nekerpa DNR molekulių su viena specifinės 5'-CCWGG sekos kopija. Šiems baltymams viena seka yra kirpimo taikinytis, o antra – alosterinis pirmojo taikinio kirpimo aktyvatorius. Sąveika su dviem atpažinimo sekos kopijomis yra būtina sąlyga EcoRII aktyvumui [22], tuo tarpu trijų atpažinimo sekos kopijų surišimas yra būtinas sutartinam abiejų DNR grandinių perkirpimui [19]. EcoRII tretinė struktūra be DNR atskleidė fermento homodimerinę organizaciją bei parodė, kad kiekvienas EcoRII monomeras susideda iš dviejų skirtingų domenų: N-galinio (EcoRII-N) bei C-galinio (EcoRII-C)[18]. Kadangi yra žinoma, jog kiekvienas domenai suriša 5'-CCWGG seką [19], kilo klausimas, kaip struktūriškai skirtingi domenai geba atpažinti vienodą DNR seką. Taip pat nebuvo aišku, kaip EcoRII sąveikauja su pertraukta konservatyvia seka 5'-CCWGG (pabraukta) būdinga Cfr10I/NgoMIV/Bse634I šeimai.

PLD nukleazių superšeima. Restrikcijos endonukleazė BfiI atpažįsta nukleotidų seką 5'-ATCGGG [23] bei yra unikali tuo, jog karmo DNR, nesant metalų jonų [24]. Kristalo struktūra [25] bei biocheminiai duomenys atskleidė [26], kad BfiI priklauso PLD nukleazių superšeimai. Baltymas sudarytas iš dviejų struktūrinių domenų. N-galinis katalizinis domenai (BfiI-N) yra panašus į nukleazę Nuc, nuo Me^{2+} nepriklausomą nespecifinę nukleazę iš fosfolipazių D superšeimos [27]. BfiI C-galinis DNR surišantis domenai (BfiI-C) turi panašią į β -statinę sanklodą, anksčiau surastą DNR surišančiame

efektoriniame REazes EcoRII domene [18] bei aptiktą DNR surišančiame domene iš augalų transkripcijos faktoriaus B3-RAV1 [28]. Buvo iškelta hipotezė, kad BfiI atsirado dėl evoliucijos metu įvykusio DNR atpažįstančio domeno susilieimo su nespecifine nukleaze, panašia į Nuc, ir taip išsivystė mechanizmas, ribojantis DNR karpymą ties vieta netoli atpažinimo sekos [29]. Vis dar neaišku, kaip BfiI atpažįsta savo taikinį bei susieja atpažinimą su katalize. Sanklodos panašumai tarp EcoRII-N bei BfiI-C skatino iširti, kaip šie domenai sąveikauja su skirtingomis atpažinimo sekomis.

Šio darbo tikslai buvo:

1. Nustatyti restrikcijos endonukleazės EcoRII sekos atpažinimo mechanizmą, naudojant kristalografinius bei biocheminius metodus.
2. Nustatyti restrikcijos endonukleazės BfiI sekos atpažinimo mechanizmą, naudojant kristalografinius bei biocheminius metodus.
3. Nustatyti restrikcijos endonukleazės Bse634I sekos atpažinimo mechanizmą, naudojant kristalografinius bei biocheminius metodus.

Mokslinis naujumas

Disertacijoje pristatomos REazės Bse634I mutanto R226A komplekso su alternatyviais taikiniai 5'-ACCGGT ir 5'-GCCGGC struktūros atskleidė, kad Bse634I specifiškumą RCCGGY taikiniui lemia tiesioginio bei netiesioginio atpažinimo mechanizmai. REazės EcoRII N- ir C-galinių domenų kompleksų su specifine DNR struktūros iliustruoja du skirtingus taikinio 5'-CCWGG atpažinimo mechanizmus. EcoRII C-galinis domenas išsuka centrinius A/T nukleotidus iš DNR spiralės. Ši deformacija leidžia fermentui panaudoti Cfr10I/NgoMIV/Bse634I REazių pogrupiui būdingus simetrinius konservatyvius struktūrinius elementus 5'-CCGG sekos atpažinimui. EcoRII N-galinio domeno struktūra yra pirmas B3 sanklodos baltymo komplekso su DNR pavyzdys. REazės BfiI C-galinio domeno komplekso su taikiniu 5'-ACTGGG struktūra leidžia pirmą sykį palyginti dviejų B3 šeimos domenų (EcoRII-N ir BfiI-C) kompleksus su DNR.

Darbo galima praktinė reikšmė

Restrikcijos endonukleazės dėl savo ypatingo specifiškumo DNR taikiniui sulaukė plataus pritaikymo kaip DNR manipuliacijų *in vitro* ir genų inžinerijos įrankis. Kristalografiniais metodais nustatomos trimatės REazių struktūros, užfiksuojančios kiekvieno atomo trimatės koordinatės molekulėje (toliau – struktūros), padeda atskleisti, kaip skirtingos struktūrinės sanklodos yra pritaikytos restrikcijos endonukleazių funkcijai atlikti.

Griežtai programuojamos DNR endonukleazės (meganukleazės) yra svarbūs šiuolaikiniai įrankiai genų perkėlimo technologijoje ir genų taisyme; jie atveria galimybes genų terapijai. REazių struktūrų nustatymas ir DNR atpažinimo molekulinį mechanizmą išaiškinimas gali padėti sukurti meganukleazes genomo redagavimui. Bse634I mutanto R226A kristalo struktūra padėjo kurti Bse634I konjugatą su DNR trigubą spiralę formuojančiu oligonukleotidu [30].

Ginamieji disertacijos teiginiai:

1. Restrikcijos endonuklezės Bse634I mutantas R226A komplekse su dviem simetriniais atpažinimo sekos RCCGGY variantais naudoja konservatyvius struktūrinius elementus CCGG tetranukleotido atpažinimui bei naudoja tiesioginio bei netiesioginio atpažinimo mechanizmus atskirti išsigimusiai R:Y bazių porai.
2. Restrikcijos endonuklezės EcoRII C-galinis katalitinis domenas sąveikaudamas su 5'-CCWGG seka išsuka centrinis nukleotidus ir naudoja konservatyvius struktūrinius elementus CCGG atpažinimui.
3. Restrikcijos endonuklezės EcoRII N-galinis alosterinis domenas naudoja anksčiau neaprašytą mechanizmą 5'-CCWGG sekos atpažinimui.
4. Kristalografiniais metodais nustatyti detalūs EcoRII-N bei BfiI-C domenų DNR atpažinimo mechanizmai yra tokie patys kaip ir augalų transkripcijos veiksnių, turinčių B3 struktūrinę sanklodą.

TYRIMŲ METODIKA

Fermentai, sorbentai ir reagentai. T4 polinukleotidkinazė pagaminta „Thermo Fisher Scientific“, proteazės tripsinas ir termolizinas pagamintos „Sigma”. Mono Q 5/50 GL ir kitos chromatografijos kolonėlės naudotos pagal gamintojo („GE Healthcare”) rekomendacijas. Kristalinimo tirpalai ir kristalinimo lėkštelės bei dažas IZIT Crystal Dye buvo įsigyti iš „Hampton Research“. Baltymų bei baltymų-DNR kompleksų koncentravimui naudotos ultrafiltracijos membranos iš „Millipore“.

Bakterijų kamienai. Naudoti *E. coli* kamienai JM109 ir ER2566.

Plazmidės. EcoRII raiškai plazmidės pDK1_wt_M.EcoRII (Cm^r), pQE30_R.EcoRII-N-H6 (Ap^r), pQE30_Y41A_R.EcoRII-H6 (Ap^r) gautos iš M. Reuter (Virusologijos Institutas, Berlynas, Vokietija). Plazmidės BfiI katalitinio mutanto K107A raiškai pET21b-pBfiIR5.1-K107A (Ap^r) ir pACYC-BfiIM9.1 (Cm^r) gautos iš V. Morin ir A. Lagunavičiaus.

Oligonukleotidai. Naudoti oligonukleotidai buvo susintetinti „Metabion“ arba „Integrated DNA Technologies”, oligodupleksai paruošti sulydant. DNR karpymo ir surišimo tyrimams viena iš grandinių 5'-gale buvo pažymėta radioaktyvia žyme.

EcoRII-Y41A ir EcoRII-N gryninimas. EcoRII-Y41A ir EcoRII-N domenai, abu su šešių histidino liekanų „inkaru“, buvo gauti pDK1_wt_M.EcoRII (Cm^r) plazmidę turinčiose *E. coli* JM109 ląstelėse su atitinkamai pQE30_R.EcoRII-Y41A-H6 (Ap^r) ir pQE30_R.EcoRII-N-H6 (Ap^r) plazmidėmis. Baltymai išgryninti pagal laukinio tipo EcoRII gryninimo schemą [31] panaudojant komercinę chromatografijos kolonėlę HiTrap. Baltymų preparatai buvo laikyti esant -20°C saugojimo buferyje A [20 mM Tris-HCl (pH 8.0 esant 25°C), 0.2 M KCl, 1.0 mM EDTA, 50% glicerolio], EcoRII-Y41A atveju į buferį buvo pridėta DTT iki 1.0 mM.

EcoRII-N ir EcoRII-C domenų kompleksų su DNR paruošimas. EcoRII-N domeno minimalus kompleksas su DNR buvo gautas panaudojant dalinės proteolizės tripsinu metodą. Tam EcoRII-N preparatas buvo sumaišytas moliniu santykiu 1:1.1 su specifiniu oligodupleksu SP9 (2 lentelė) proteolizės buferyje A [20 mM Tris-HCl (pH 8.0 esant 25°C), 0.2 M KCl, 1 mM EDTA, 10% glicerolio] ir pridėtas tripsinas iki proteazės:baltymo masės santykio 1:75. Reakcija vykdyta 4 val. 37°C. Tinkamas kristalinimui minimalus EcoRII-N domeno kompleksas su DNR buvo išgrynintas panaudojant heparin-sefarozę ir Mono Q 5/50 GL kolonėles bei sukonzentruotas koncentravimo buferyje A [20 mM Tris-HCl (pH 8.0 esant 25°C), 0.2 M KCl, 10% glicerolio, 0.1 mM EDTA] iki 18.5 mg/ml. EcoRII-C domenas buvo gautas iš EcoRII-Y41A baltymo preparato pritaikius dalinę proteolizę termolizinu pagal aprašytą metodiką [32]. Išgrynintas EcoRII-C domenas buvo sumaišytas su specifiniu oligodupleksu SP12 (2 lentelė) esant moliniam santykiui 1:1 koncentravimo buferyje B [20 mM Tris-HCl (pH 8.0 esant 25°C), 0.4 M KCl, 10% glicerolio, 0.1 mM EDTA, 5 mM Ca-OAc₂].

BfiI-K107A gryninimas. BfiI aktyvaus centro K107A mutanto (BfiI-K107A) raiška bei gryninimas atlikti pagal schemą, naudotą laukinio tipo BfiI [33].

2 lentelė. Darbe naudotų oligodupleksų sekos ir trumpi aprašymai

Duplek-sas	Seka	Aprašymas
Oligonukleotidai ^a , naudoti kristalinimui su EcoRII domenais		
SP9	5' -GCCCTGGCG-3' 3' -CGGGACCGC-5'	9 bazių porų (bp) specifinis
SP12	5' -TAGCCTGGTCTGA-3' 3' -ATCGGACCAGCT-5'	12 bp specifinis
Oligonukleotidai ^{ab} , naudoti EcoRII-N domeno sąveikos su modifikuota DNR tyrimams		
T/A	5' -CGCACGACTT <u>CCTGGA</u> AAGAGCACGC-3' 3' -GCGTGCTGA <u>AGGACC</u> TTCTCGTGCG-5'	25 bp specifinis
U/A	5' -CGCACGACTT <u>CCUGGA</u> AAGAGCACGC-3' 3' -GCGTGCTGA <u>AGGACC</u> TTCTCGTGCG-5'	25 bp specifinis modifikuotu taikiniu
T/2	5' -CGCACGACTT <u>CCTGGA</u> AAGAGCACGC-3' 3' -GCGTGCTGA <u>AGG2CC</u> TTCTCGTGCG-5'	25 bp specifinis modifikuotu taikiniu
U:A	5' -CGCACGACTT <u>UTGGA</u> AAGAGCACGC-3' 3' -GCGTGCTGA <u>AGAACC</u> TTCTCGTGCG-5'	25 bp specifinis modifikuotu taikiniu
A:U	5' -CGCACGACTT <u>CCTAGA</u> AAGAGCACGC-3' 3' -GCGTGCTGA <u>AGGAUC</u> TTCTCGTGCG-5'	25 bp specifinis modifikuotu taikiniu
^{5m} isoC/ /isoG	5' -CGCACGACTT <u>CC^{5m}iCGGA</u> AAGAGCACGC-3' 3' -GCGTGCTGA <u>AGG iGC</u> TTCTCGTGCG-5'	25 bp specifinis su modifikuotu taikiniu
NS33	5' -AATGGGCTCGCACGGCGGCTATTATCGATTGTA-3' 3' -TTACCCGAGCGTGCCGCCGATAATAGCTAACAT-5'	33 bp nespecifinis
Oligonukleotidai ^{ac} , naudoti EcoRII-N ir EcoRII-C domenu sąveikos su hemimetilinta DNR tyrimams		
NM	5' -CGTAGCCTGGTTCGATC-3' 3' -GCATCGGACCAGCTAG-5'	16 bp specifinis
HM(A)	5' -CGTAGCCTGGTTCGATC-3' 3' -GCATCGGAMCAGCTAG-5'	16 bp specifinis su modifikuotu taikiniu grandinėje A
HM(T)	5' -CGTAGCMTGGTTCGATC-3' 3' -GCATCGGACCAGCTAG-5'	16 bp specifinis su modifikuotu taikiniu grandinėje T
DM	5' -CGTAGCMTGGTTCGATC-3' 3' -GCATCGGAMCAGCTAG-5'	16 bp specifinis su modifikuotu taikiniu abiejose grandinėse
Oligonukleotidai ^a , naudoti kristalinimui su BfiI domenais		
S12	5' -AGCACTGGGTCG-3' 3' -TCGTGACCCAGC-5'	12 bp specifinis be BfiI karpymo vietos
NS8	5' -TACCGGTA-3' 3' -ATGGCCAT-5'	8 bp nespecifinis

Oligonukleotidai^a, naudoti kristalinimui su Bse634I-R226A

GC-1	5' -TCGCGCCGGCGCG-3' 3' -GCGCGGCCGCGCT-5'	12 bp specifinis
AT-1	5' -TCGCACCGGTGCG-3' 3' -GCGTGGCCACGCT-5'	12 bp specifinis
AT-2	5' -TTCGACCGGTCGA-3' 3' -AGCTGGCCAGCTT-5'	12 bp specifinis

Oligonukleotidai^{bd}, naudoti Bse634I surišimui su DNR bei DNR karpymui tirti

NS	5' -AGCGTAGCACTGGGCTGCTAGTC-3' 3' -TCGCATCGTGACCCGACGATCAG-5'	23 bp nespecifinis
AT	5' -CGCACGATCACCGGTGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGTGGCCACTACGTGCG-5'	23 bp specifinis
GC	5' -CGCACGATCGCCGGCGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGCGGCCGCTACGTGCG-5'	23 bp specifinis
TA	5' -CGCACGATCTCCGGAGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGAGGCCCTCTACGTGCG-5'	23 bp turintis nekanoninį taikinį
CG	5' -CGCACGATCCCCGGGGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGGGGCCCTACGTGCG-5'	23 bp turintis nekanoninį taikinį
AU	5' -CGCACGATCACCGGUGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGUGGCCACTACGTGCG-5'	23 bp turintis nekanoninį modifikuotą taikinį
IC	5' -CGCACGATCICCGGCGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGCGGCCICTACGTGCG-5'	23 bp turintis nekanoninį modifikuotą taikinį
UA	5' -CGCACGATCUCGGGAGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGAGGCCUCTACGTGCG-5'	23 bp turintis nekanoninį modifikuotą taikinį
CI	5' -CGCACGATCCCCGGIGATGCACGC-3' 3' -GCGTGCTAGIGGCCCTACGTGCG-5'	23 bp turintis nekanoninį modifikuotą taikinį

^a Restrikcijos endonukleazės atpažinimo seka yra pabraukta; ^b 2 žymi 2-aminopuriną, **I** - inoziną, **U** - uracilą, ^{5m}**iC** - 5-metil-izocitoziną, **iG** - izoguaniną; ^c **M** žymi 5-metilcitoziną; ^d centrinis CCGG tetranukleotidas yra pabrauktas.

BfiI-N ir BfiI-C domenų kompleksų su DNR paruošimas. BfiI-K107A buvo sumaišytas su specifiniu oligodupleksu S12 (2 lentelė) ir proteaze termolizinu proteolizės buferyje B [20 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25°C), 0.2 M KCl, 1 mM DTT, 4 mM Ca-OAc₂, 10% glicerolio]; po 20 valandų inkubacijos 37°C temperatūroje reakcija buvo sustabdyta PMSF [34]. Reakcijos mišinyje molinis DNR:BfiI-K107A santykis buvo 2.2:1, proteazės:BfiI-K107A masės santykis – 1:10. Iš proteolizės mišinio katalitiškai neaktyvus BfiI-N domenas buvo išgrynintas panaudojant heparin-sefarozės kolonėlę, sukonzentruotas koncentravimo buferyje C [10 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25°C), 0.1 M KCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glicerolio] ir sumaišytas moliniu santykiu 1:1 su oligodupleksu NS8 (2 lentelė). BfiI-C domeno kompleksas su DNR iš proteolizės mišinio buvo išgrynintas panaudojant Mono Q 5/50 GL kolonėlę bei perkeltas į koncentravimo buferį C.

Bse634I ir Bse634I-R226A gryninimas. Laukinio tipo Bse634I ir jo mutanto R226A (Bse634I-R226A) raiška bei gryninimas atlikti pagal aprašytą metodiką [35].

Bse634I-R226A kompleksų su DNR paruošimas. Išgrynintas Bse634I-R226A buvo atskirai sumaišytas su skirtingais specifiniais oligodupleksais GC-1, AT-1 arba AT-2 (2 lentelė) moliniu santykiu 1:1 kristalinimo buferyje [20 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25°C), 50 mM NaCl, 5 mM CaCl₂].

Baltymo-DNR kompleksų kristalinimas. Esant kambario temperatūrai kristalinimo lėkštelėje buvo sumaišomi rezervuaro tirpalas ir sukonzentruotas ultrafiltracijos būdu komplekso tirpalas (3 lentelė). Kristalinimo eksperimentai buvo atlikti sėdinčio lašo metodu, esant 18-20°C temperatūrai.

3 lentelė. Baltymų-DNR kompleksų kristalinimas (tirpalų pH nurodytas esant 25°C)

Kompleksas	C, mg/ml	V, µl	Rezervuaro tirpalas	V, µl
EcoRII-N/SP9	18.5	2	1 M Na-OAc (pH 4.5), 0.2 M Li-OAc, 10% glicerolio	0.5
EcoRII-C/SP12	4.6	0.5	26% PEG1500, 25% glicerolio	0.2
BfiI-N-K107A/NS8	8.0	0.5	0.01 M MgCl ₂ , (CH ₃) ₂ AsO ₂ Na (pH 7.5), 1.0 M Li ₂ SO ₄	0.5
BfiI-C/S12	1.7	0.5	0.49 M NaH ₂ PO ₄ , 0.91 M K ₂ HPO ₄ (pH 6.9)	0.5
Bse634I-R226A/GC-1	4-8	0.5	100 mM Na-OAc (pH 4.25-5.5), 10 mM CaCl ₂ arba Ca-OAc ₂ , 4-8 % PEG8000.	0.5
Bse634I-R226A/AT-1				
Bse634I-R226A/AT-2			0.1 M Bis-Tris (pH 5.5), 0.5 % polivinilpirolidono, 16 % PEG400	

Rentgeno difrakcijos duomenų surinkimas ir struktūrų sprendimas. Difrakcijos duomenys iš EcoRII-N bei EcoRII-C domėnų kristalų bei Bse634I-R226A kristalų surinkti EMBL/DESY (Hamburgas, Vokietija) (4 lentelė). EcoRII-C domeno kristalas buvo užšaldytas be krioprotektoriaus, N-galinio domeno kristalas prieš užšaldymą buvo mirkytas krio-mišinyje A [rezervuaro tirpalas ir PEG400 iki 20%], Bse634I kristalai mirkyti krio-mišinyje B [rezervuaro tirpalas ir glicerolio iki 20-25%]. Difrakcijos duomenys iš BfiI-C domeno kristalo surinkti besisukančio anodo Rentgeno difraktometru („Rigaku“, Japonija), esančiu Vilniaus Universitete Biotechnologijos institute, iš N-galinio – su analogišku prietaisu esančiu IICMB (Lenkija) (4 lentelė). Prieš užšaldant BfiI C-galinio domeno kristalai buvo mirkyti krio-mišinyje C [rezervuaro tirpalas ir glicerolio iki 25%], N-galinio – krio-mišinyje D [rezervuaro tirpalas ir glicerolio iki 25%]. Kiekvieno kristalo Rentgeno difrakcijos vaizdai buvo paversti į duomenų rinkinius programomis MOSFLM [36], SCALA [37] ir TRUNCATE [38]. Struktūros buvo išspręstos molekulinio pakeitimo metodu MOLREP [39] arba AMORE [40] programomis, su atomų koordinatėmis iš atitinkamų REazių struktūrų be DNR (4 lentelė). Pradinės fazės ir elektroninio tankio žemėlapiai gauti su SIGMAA programa [41].

4 lentelė. Duomenų rinkinių (matuota esant 100 K) statistika, fazavimo informacija bei struktūrų patikslinimo statistika.

Duomenų rinkinys	EcoRII-N/SP9	EcoRII-C/SP12	Bfil-C/S12	Bfil-N-K107A/NS8	Bse634I-R226A/GC-1	Bse634I-R226A/AT-1	Bse634I-R226A/AT-2
Simetrijos grupė	P4 _{3,2}	P2 _{1,2}	P6 ₅	I4	P2 _{1,2}	P2 _{1,2}	P2 ₁
Gardelės konstantos, a, b, c(Å) α, β, γ(°)	a=43.2, b=43.2, c=253.6 α=β=γ=90.0	a=77.1, b=58.0, c=61.0 α=β=γ=90.0	a=175.18, b=175.18, c=35.79 Å α=γ=90.0, β=120	a=163.44, b=163.49, c=68.93 Å α=β=γ=90.0	a=72.01, b=83.63, c=123.34 α=β=γ=90	a=71.94, b=87.39, c=125.13 α=β=γ=90	a=106.88, b=115.31, c=130.24 α=γ=90, β=112.5
Skiriamoji geba (Å)	63.5-2.5	47.84-2.6	50.57-3.2	40.96-2.44	62.1-2.3	55.6-2.34	65.1-2.7
Atspindžių skaičius	62633	119326	75356	87976	125217	143192	366610
Unikalūs atspindžiai	9055	8835	10618	32775	33372	30943	80299
Pilnumas (%)	99.1 (94.3) [#]	99.8 (99.8)	100 (100)	95.7 (83.8)	99.1 (95.2)	90.6 (64.5)	100 (100)
I/σ(I)	6.9 (7.0)	13.0 (2.0)	13.3 (7.2)	7.9 (3.4)	9.1 (2.5)	22.8 (3.0)	20.3 (3.1)
R _{sulteta} ^{\$}	0.07 (0.08)	0.05 (0.33)	0.15 (0.24)	0.12 (0.25)	0.07 (0.31)	0.05 (0.33)	0.06 (0.39)
Struktūros sprendimas molekulinu pakeitimu							
PDB; a.r. fragmentas: grandinė	INA6		2C1L		1KNV		
	4-170:B	284-402:B	200-347:A	1-180:A	95-293:A		
Struktūros patikslinimo statistika (testiniame rinkinyje 10% unikalių atspindžių)							
Baltymo/DNR atomai	1334/363	1812/486	2642/972	5854/0	4761/526	4734/526	18743/3562
R _{krist} /R _{neprikt} [‡]	0.19/0.23	0.24/0.29	0.18/0.21	0.20/0.24	0.23/0.28	0.24/0.29	0.23/0.27
SD jungties ilgių (Å)/kampu (°) [‡]	0.016/1.916	0.006/1.012	0.005/0.795	0.002/0.548	0.007/1.009	0.009/1.186	0.01/3.820

[#] Skliausteliuose pateiktos vertės išoriniam skiriamosios gebos ruožui (~1.5 Å). ^{\$}R_{sulteta}=∑ I_{nit}<I_h>/∑ I_h kur I_{nit} atspindžio h i-tojo matavimo intensyvumo vertė ir <I_h> yra vidutinė pamačiuota atspindžio h intensyvumo vertė. [‡]R_{krist}=∑ I_h^{calc}/∑ I_h^{obs} - F_h^{calc}/∑ I_h^{obs}. R_{neprikt} apskaičiuotas kaip R_{krist} bet tikrai tiems atspindžiams kurie nebuvo naudoti patikslinimui. [‡]Vidutinis standartinis nuokrypis.

Atominiai modeliai buvo keičiami COOT [42] programa, naudojant FWT [41] bei OMIT [43] elektroninio tankio žemėlapius, po to tikslinti programomis CNS [44], REFMAC [45] arba PHENIX [46] (4 lentelė). Struktūrų stereocheminiai parametrai įvertinti su programomis PROCHECK [47], WHAT IF [48] ir MolProbity [49] (4 lentelė).

DNR surišimo tyrimai. Radioaktyvia žyme žymėtas oligodupleksas buvo sumaišytas su įvairiais baltymų kiekiais surišimo buferyje [40 mM Tris-HCl (pH 8.3 esant 25°C), 10% glicerolio, 0.2 mg/ml JSA] ir po ~0.5 val. inkubacijos, laisva DNR ir baltymo-DNR kompleksai atskirti elektroforeze (2-3 val.) 6-8% poliakrilamidiniame gelyje (PAAG) natyviomis sąlygoms [40 mM Tris-OAc (pH 8.3 esant 25°C)]. Tiriant EcoRII-N domeno sąveiką su DNR (2 nM) į surišimo bei elektroforezės buferius buvo pridėta EDTA iki 0.1 mM. DNR (0.1 nM) surišimo tyrimai EcoRII-C domeno atveju buvo vykdyti buferiuose esant 5 mM Ca²⁺ ir 2 mM DTT, Bse634I atveju duplekso (0.1 nM) surišimo tyrimai vykdyti buferiuose esant 5 mM Ca²⁺. Po elektroforezės gelis išdžiovintas, o radioaktyvus DNR signalas detektuotas su fosforescenciniais ekranais Cyclone™ skenerio pagalba.

DNR oligodupleksų karpymas. DNR karpymas EcoRII-C domenu tirtas karpymo buferyje A [33 mM Tris-OAc (pH 7.9 esant 25°C), 66 mM K-OAc, 10 mM Mg-OAc₂, 2 mM DTT, 0.1mg/ml JSA]: 200 nM žymėto oligoduplekso buvo inkubuota su 1 μM baltymo (dimero) esant 25°C temperatūrai. Bse634I aktyvumas tirtas karpymo buferyje B [10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1mg/ml JSA]: 100 nM žymėto oligoduplekso (2 lentelė) buvo inkubuota su 100 nM baltymo (tetramero) esant 25°C arba 50°C temperatūrai. DNR karpymo produktai buvo atskirti elektroforezės būdu denatūruojančiame poliakrilamido gelyje pagal paskelbtą metodiką [50] ir gelis analizuotas taip pat, kaip aprašyta aukščiau. Fosfodiesterinio ryšio hidrolizės greičio netiesinė regresinė analizė atlikta programų GnuPlot [51] arba KyPlot [52] pagalba. Eksponentinis hidrolizės greitis aprašomas konstanta *k* ir rezultatas lentelėse yra pateikiamas pavidalu “optimali reikšmė ± vienas standartinis nuokrypis”.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

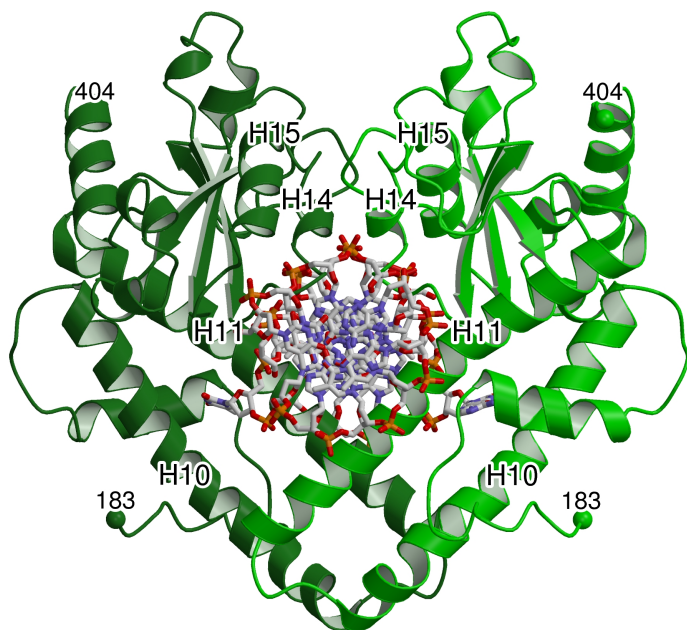
1. *EcoRII-C* domeno sąveikos su DNR tyrimai

1.1. Struktūroje DNR oligodupleksas surištas dviejose orientacijose

Dalinės proteolizės metodu gautas EcoRII-C domenas buvo iškristalintas su 12 bp ilgio oligonukleotidu SP12 (žr. 2 ir 3 lentelės bei „Tyrimų metodiką“), kuris turi seką 5'-CCWGG. Struktūra buvo išspręsta molekulinio pakeitimo metodu, panaudojant kaip pradinį modelį EcoRII be DNR atomų koordinatės, ir palaipsniui patikslinta pagal 2.6 Å skiriamosios gebos duomenų rinkinį su simetrijos grupe $P2_12_12$ (žr. „Tyrimų metodiką“, fazavimas ir patikslinimo statistika pateikti 4 lentelėje). Asimetriniame vienete yra viena baltymo grandinė ir viena DNR grandinė. Esant kristalo simetrijos grupei $P2_12_12$, baltymo grandinė yra atvaizduojama į kitą EcoRII-C dimero grandinę. Pritaikant antro laipsnio simetrijos ašį, DNR grandinė yra atvaizduojama į komplementarią DNR grandinę. Kadangi DNR dupleksas panaudotas kristalinime nėra palindrominis, jis negali turėti antro laipsnio simetrijos. Tariamasis prieštaravimas buvo paaiškintas darant prielaidą, kad DNR išsidėsto dvejopai baltymo dimero ašies atžvilgiu ir kristale yra dviejose priešingose orientacijose su vienoda tikimybe. Struktūros patikslinimas prieš duomenų rinkinį su žemesne simetrija $P2_1$ nerodė geresnio modelio atitikimo eksperimentiniams duomenims. Taigi, DNR buvo sumodeliuota kaip dvi DNR grandinės, abi turinčios tą patį pagrindinės grandinės karkasą.

1.2. Bendra EcoRII-C domeno struktūra su DNR

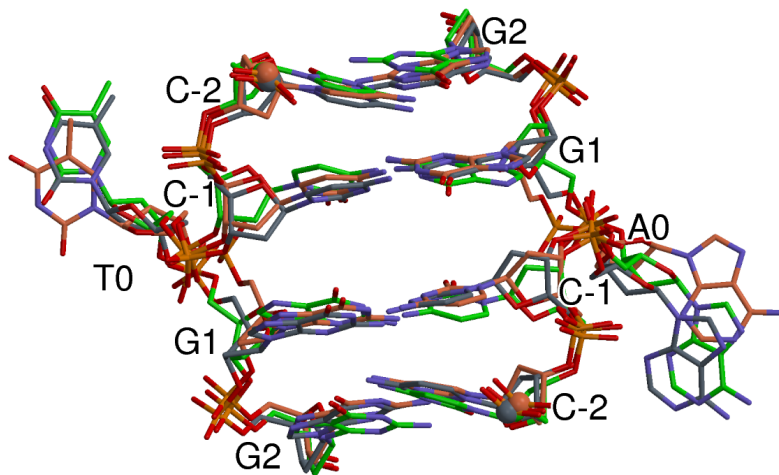
Komplekse su DNR EcoRII C-domeno antrinė struktūra yra identiška apo-EcoRII antrinei struktūrai [53]. Du EcoRII-C monomerai sudaro žiedo formos struktūrą, kuri pilnai apgaubia DNR (1 pav.). Kontaktai tarp EcoRII-C monomerų sukuria didelį DNR surišimo paviršių: baltymo-DNR sąveikos paviršiuje yra paslėpta beveik 4900 Å². EcoRII-C dėl N-galinių ir C-galinių dimerizacijos kontaktų yra paslėpta apie 2400 Å² monomero paviršiaus. DNR mažojo griovio pusėje N-galinis dimerizacijos paviršius atsiranda dėl sąveikaujančių ilgųjų α -spiralių H10 ir H11 (1 pav.). Šis paviršius daugiausiai hidrofobinis ir uždengia 1600 Å² prieinamo paviršiaus plotą. DNR didžiojo griovio pusėje C-galinis dimerizacijos paviršius yra sudarytas iš kontaktų tarp konservatyvių katalitinių domenų; kontaktus sudaro α -spiralės H14 ir H15 (1 pav.). Šis paviršius daugiausiai hidrofiliškas ir uždengia 840 Å² prieinamo paviršiaus plotą. Aprašytas EcoRII-C dimerizacijos ant DNR būdas yra panašus į stebimą IIP tipo REazėje PspGI [54] ir IIF tipo REazėje Ecl18kI [55].



1 paveikslas. EcoRII-C domeno komplekso su 12 bp DNR erdvinė struktūra. DNR yra nuspalvinta pagal CPK spalvų kodavimo schemą. Skirtingi baltymo monomerai nuspalvinti atitinkamai šviesiai žaliai ir tamsiai žaliai. Pažymėti antrinės struktūros elementai, dalyvaujantis dimerizacijoje: α -spiralės H14 bei H15 sąveikauja tarpusavyje iš DNR didžiojo griovio pusės, o α -spiralės H10, H11 – iš DNR mažojo griovio pusės. Žalios sferos žymi N-/C-galinių aminorūgščių C α atomus.

1.3. EcoRII-C taikinyje CCWGG išsuka centrinius nukleotidus

DNR komplekse su EcoRII-C turi neįprastą konformaciją: atpažinimo sekos A/T nukleotidai yra išsukti iš dvigrandinės DNR spiralės ir fosfodiesterinis karkasas yra suspaustas, dėl to 5 bp CCWGG seka įgauna nepertraukto tetranukleotido CCGG formą (2 pav.).



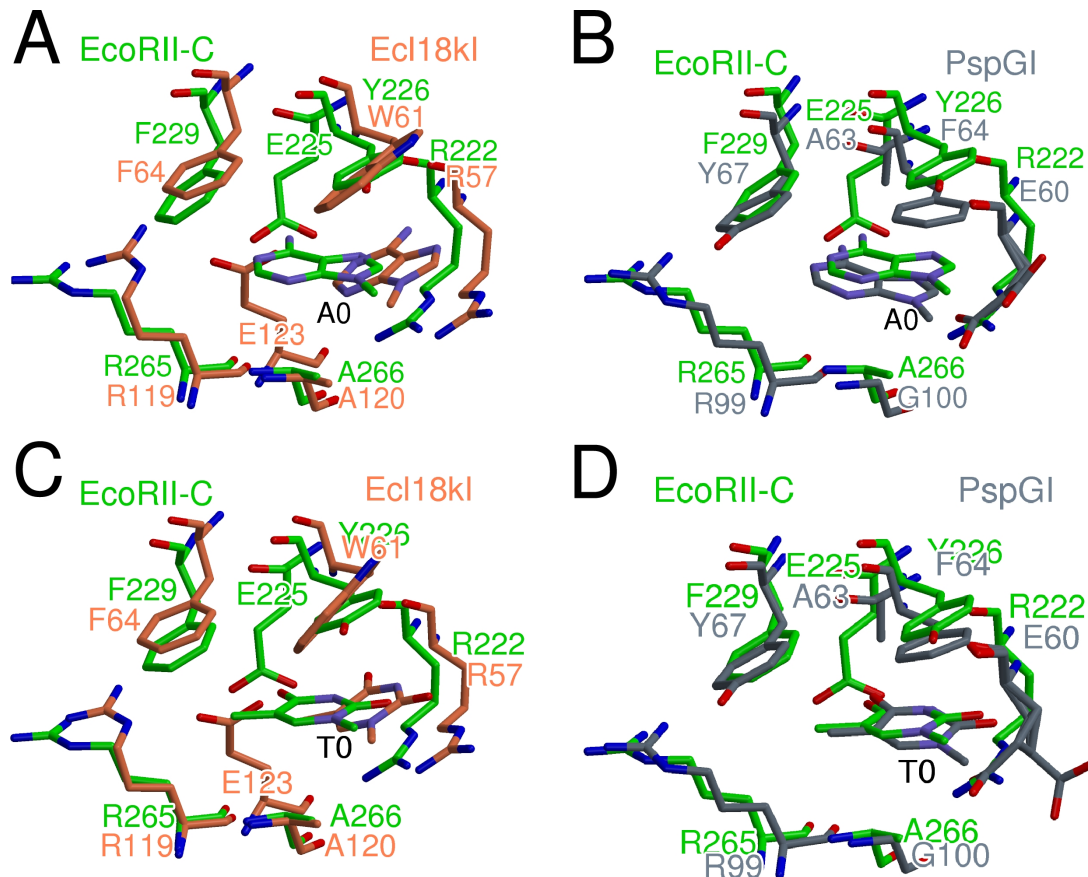
2 paveikslas. Taikinio deformacija komplekse su EcoRII-C. Struktūrinis bazės išsukančių REazių sugretinimas. EcoRII-C pavaizduota žalia, PspGI [PDB ID 3BM3] – pilka, o Ecl18kI [PDB ID 2FQZ] – rausva spalva. Kaip sfera yra parodyta hidrolizuojamos fosfodiesterinės jungties fosforo atomo pozicija ties C-2 nukleotidu.

Analogiška 5 bp į 4 bp DNR deformacija yra stebima REazių Ecl18kI [55] ir PspGI [54] struktūrose. Įdomu tai, kad REazių atpažinimo sekose CCNGG (Ecl18kI) ir CCWGG (EcoRII-C/PspGI) persidengiantis CC:GG dinukleotidai (pabraukta) beveik sutampa ir struktūriniame kompleksų sugretinime (2 pav.). Tuo tarpu, centriniai nukleotidai EcoRII-C–DNR komplekse yra persukti ilgosios DNR ašies atžvilgiu (tos pačios DNR grandinės 5'-galo kryptimi) lyginant su Ecl18kI–DNR, bei beveik sutampa su PspGI–DNR išsuktų nukleotidų pozicijomis (2 pav.). Tokie išsuktų nukleotidų pozicijų skirtumai galėtų būti paaiškinami tuo, kad EcoRII-C ir PspGI atpažįsta tik A arba T, o Ecl18kI neturi specifiškumo centrinei bazių porai. DNR deformacija, stebima EcoRII-C–DNR kristalinėje formoje, patvirtina centrinių nukleotidų išsukimo tirpale

tyrimų rezultatus. Taikinio CCWGG centrinėje padėtyje vietoj adenino bazės įvedus 2-aminopuriną buvo stebėtas ženklus (12-kartinis) fluorescencijos intensyvumo padidėjimas prisijungus fermentui [56]. Suspaustoji DNR konformacija yra palaikoma baltymui surišant išsuktų nukleotidų fosfatus per Arg262 šoninę grandinę. Sekų paieška leido identifikuoti baltymus (sekų palyginys neparodytas), kurie yra pastebimai panašūs į pilno ilgio EcoRII (toliau vadinami EcoRII šeima). Įdomu tai, kad EcoRII šeimoje a.r. sekos 262 pozicijoje argininas yra griežtai konservatyvus. Taip pat galima funkcine šios aminorūgšties svarbą netiesiogiai patvirtina tai, kad struktūriškai ekvivalentiškų Arg116 (Ecl18kI) ir Arg96 (PspGI) mutacijos į alaniną panaikino nukleotidus išsukančių REazių sąveiką su DNR [57].

1.4. EcoRII-C galimas centrinių T/A atpažinimo mechanizmas

Abi iš DNR spiralės išsuktos A ir T bazės atsiduria skirtingų baltymo monomerų suformuotose surišimo kišenėse. Kiekviena surišimo kišenė yra sudaryta Arg222, Glu225, Tyr226, Phe229 iš α -spiralės H10 bei Arg265, Ala266 iš α -spiralės H11 (3 pav.).



3 paveikslas. Išsuktų iš DNR spiralės bazių pozicija EcoRII-C surišimo kišenėje. (A) EcoRII-C (žalia) ir Ecl18kI (rausva) surišimo kišenių su išsukta A baze gretinys. (B) EcoRII-C ir PspGI (pilka) surišimo kišenių su išsukta A baze gretinys. (C) EcoRII-C ir Ecl18kI surišimo kišenių su išsukta T baze gretinys. (D) EcoRII-C ir PspGI surišimo kišenių su išsukta T baze gretinys. Gretinių generavimui naudotos Ecl18kI–DNR [PDB ID 2FQZ] bei PspGI–DNR [PDB ID 3BM3] struktūros.

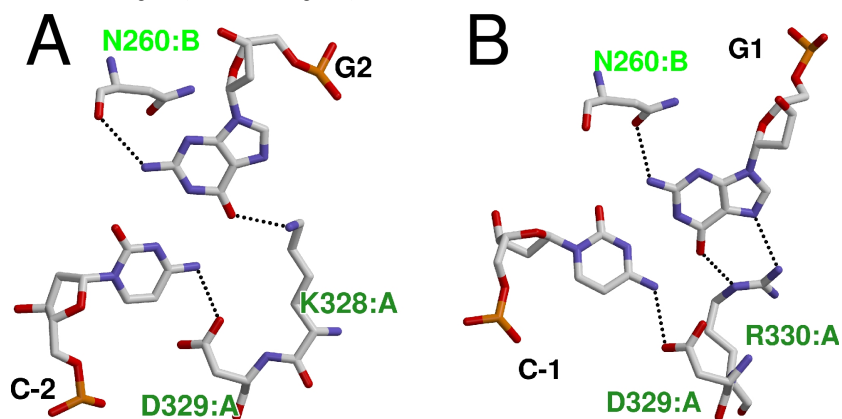
Struktūrinis palyginimas rodo, kad surišimo kišenė jau yra suformuota apo-EcoRII monomere ir bazės patalpinimas nesukelia didelių kišenę sudarančių aminorūgščių pozicinių pokyčių. EcoRII-C, PspGI ir Ecl18kI surišimo kišenės yra labai panašios (3 pav.).

Analizuojant kompleksio struktūrą bandėme atsakyti į klausimą, kaip kišenės sudėtis gali lemti, kad EcoRII-C yra specifiskas CC(T/A)GG, bet ne CC(C/G)GG sekai. Komplekse su EcoRII-C išsuktos A ir T bazės yra įspaustos tarp Tyr226 aromatinio žiedo ir Arg222 šoninės grandinės atomų (3 pav.). Pažymėtina, kad T bazės C5 metilo grupė yra išsidėsčiusi arti (3.7 Å) Phe229 aromatinio žiedo, kas yra palanku van der Valso (van der Waals) sąveikai, o A bazės N6 atomas yra arti (3.1 Å) Glu225 šoninės grandinės deguonies atomo, kas liudytų apie galimą vandenilinės jungties susidarymą, nors a.r. išsidėstymo geometrija ir nėra optimali. Teoriškai, šios baltymo-DNR sąveikos gali leisti atskirti centrinę T:A bazių porą nuo C:G bazių poros išsukimo kišenėse. Iš tiesų, *in silico* pakeitus T bazę į C būtų pašalintas van der Valso kontaktas tarp T metilo grupės ir Phe229 aromatinio žiedo, o A bazę pakeitus į G būtų suardytas vandenilinis ryšys su Glu225 karboksilato deguonimi (3 pav.). Taipogi G bazės *in silico* įterpimas sukelia sterinius trukdžius Phe229 aromatiniam žiedui (2.9 Å). EcoRII-C–DNR kompleksio struktūros analizė neprieštarauja publikuotiems EcoRII-C sąveikos su DNR tirpale tyrimų rezultatais [50], kur buvo parodyta, kad EcoRII-C karmo oligodupleksus su taikinio centre esančiais nesuporuotais A/A bei T/T nukleotidais tokiu pat greičiu, kaip ir natūralų CC(A/T)GG taikinį, o pakeitus išsukamus nukleotidus į G/G arba C/C karpymo greitis sumažėjo 1000 kartų. Pagal pasiūlytą EcoRII-C ir PspGI "dvigubos patikros" mechanizmą DNR karpymo efektyvumui yra svarbus ir taikinio centrinės bazių poros Watson-Crick sąveikos stiprumas, ir išsuktų bazių tiesioginiai kontaktai su išsukimo kišenę sudarančiomis a.r.. Svarbu paminėti, kad Glu225 ir Phe229, kurios, kaip spėjama, svarbios išsuktų bazių atpažinimui, yra griežtai konservatyvios EcoRII šeimoje. Įdomu tai, kad nors Ecl18kI ir nėra specifiska centriniai bazių porai, jos išsukimo kišenėse yra a.r., struktūriškai ekvivalentiškos konservatyvioms Glu225 ir Phe229 – Phe64 ir Glu123, atitinkamai (3 pav.). Be to, PspGI, kuri, kaip ir EcoRII-C, yra specifiska CC(T/A)GG sekai, turi Tyr67 struktūriškai atitinkantį Phe229, bet Ala63 pakeičia Glu225 (3 pav.). Papildoma mutacinė ir/arba kristalografinė analizė yra reikalinga nustatant, kaip REazės EcoRII-C ir PspGI atpažįsta CC(A/T)GG taikinio centrinę bazių porą.

1.5. EcoRII-C sąveika su taikinio CCWGG simetrine dalimi CC:GG

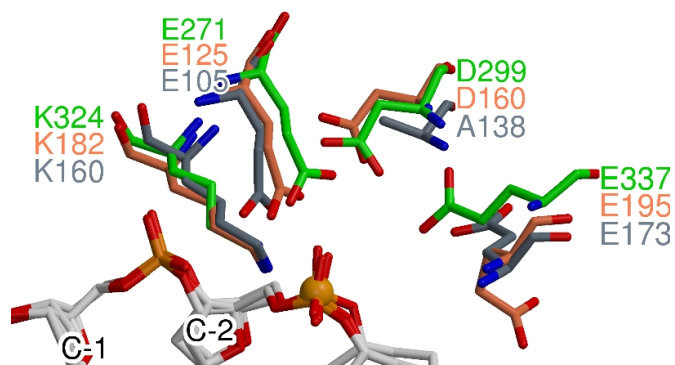
EcoRII-C sudaro tiesioginius kontaktus su atpažinimo sekos simetrine dalimi CC:GG. Kontaktuose dalyvauja konservatyvus nepertrauktas motyvas Lys328, Asp329 ir Arg330 (4 pav.), esantis simetrinių α -spiralių H14 N-gale. Šios spiralės dar vadinamos "atpažinimo" spiralėmis pagal analogiją su kitomis CCGG tetranukleotidą atpažįstančiomis REazėmis [58]. Dėl centrinių A:T nukleotidų išsukimo (aptarta 1.3. dalyje) du CC:GG dinukleotidai suartėja ir kiekvienas EcoRII-C monomeras sudaro po identišką kontaktų rinkinį su viena CC:GG seka, todėl bus aptartas tik vienas kontaktų rinkinys. Iš didžiojo DNR griovio vieno iš monomerų liekana Asp329 sudaro vandenilines jungtis su gretimų C-2 ir C-1 citozinų (bazių numeracija pagal 2 pav.) N7 atomais; Lys328 – su G2 guanino O6 atomu; Arg330 – su G1 guanino O6 ir N7 atomais (4 pav.). Iš DNR mažojo griovio pusės kito monomero Asn260, esantis α -spiraleje H11,

gali sudaryti vandenilines jungtis su gretimų G1 ir G2 guaninų N2 atomais (4 pav.). Toks sekos atpažinimo struktūrinis modelis patvirtina anksčiau atliktus Asp329, Lys328 ir Arg330 aminorūgščių mutacinius tyrimus [59]. Nenuostabu, kad visos keturios a.r. yra griežtai konservatyvios EcoRII šeimoje. Taigi, struktūrinis tyrimas patvirtina, kad EcoRII-C domenas priklauso tų REazių šeimai, kurios du CC:GG dinukleotidus skirtingų taikinių kontekstuose atpažįsta simetriškai, naudodamos bendrą struktūriškai konservatyvų a.r. motyvą [54][55].



1.6. EcoRII-C aktyvus centras

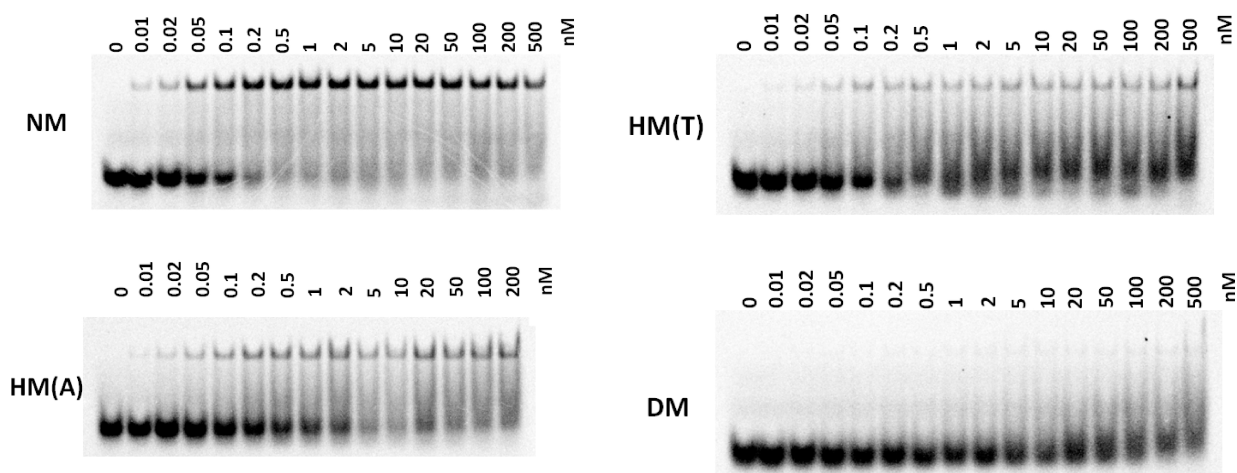
EcoRII-C dimeras turi du aktyvius centrus, būdingus PD-(D/E)XK nukleazei. Kiekvieno monomero aktyvus centras yra formuojamas iš Glu271, Asp299, Lys324 ir Glu337 a.r. liekanų, kurios struktūroje yra arti hidrolizuojamos fosfodiesterinės DNR jungties (5 pav.). Anksčiau atlikti DNR sąveikos tyrimo eksperimentai su EcoRII-C mutantais parodė šių a.r. svarbą fermento aktyvumui [59]. Be to, EcoRII-C aktyvaus centro a.r. yra griežtai konservatyvios EcoRII šeimoje. Struktūrinis EcoRII-C–DNR kompleksų sugretinimas su apo-EcoRII rodo nežymius aktyvaus centro a.r. pozicinius pokyčius (gretinys neparodytas). Tačiau EcoRII-C sugretinimas su Ecl18kI bei PspGI DNR kompleksais rodo, kad aktyvaus centro a.r. bei skeliamų fosfodiesterinių jungčių fosfatų atomų pozicijos beveik sutampa (5 pav.). Nepaisant to, kad EcoRII-C–DNR kristalinimo laše buvo Ca^{2+} jonų, būdingo Ca^{2+} elektronų tankio EcoRII-C aktyviame centre aptikti nepavyko.



5 paveikslas. EcoRII-C aktyvus centras. EcoRII-C (žalia), Ecl18kI [PDB ID 2FQZ] (rausva), bei PspGI [PDB ID 3BM3] (pilka) aktyvių centrų sugretinimas. DNR nuspalvinta pagal CPK schemą. Skeliamos fosfodiesterinės jungties fosfato atomas parodytas kaip oranžinė sfera.

1.7. EcoRII-C jautrumas substrato metilinimui

Ankščiau atlikti tyrimai parodė, kad įvedus į CCWGG taikinį 5-metilcitoziną vietoj C-1 citozino, fago M13 DNR tampa atspari karpymui EcoRII-C [60]. Tuo tarpu yra žinoma, kad pilno ilgio EcoRII sugeba karpyti DNR, kai 5-metilcitozino modifikacija yra įvesta vienoje iš DNR grandinių, esant reakcijos tirpale nemodifikuotam dupleksui [61]. Norėdami patikrinti, kaip metilo grupės įtakoja EcoRII-C sąveiką su DNR, mes atlikome DNR surišimo eksperimentus (žr. „Tyrimų metodiką“). Tyrimai parodė, kad EcoRII-C neriša dimetilinto oligoduplekso (DM) su 5-metilcitozinu abiejose grandinėse, bet išlaiko afiniškumą DNR su hemimetilintu taikiniu (HM(T) ir HM(A)) (6 pav.). Tačiau hemimetilintos DNR atveju gelyje stebimos kompleksui būdingos juostelės yra neryškios, kas rodo mažesnį kompleksų stabilumą.



6 paveikslas. EcoRII-C sąveikos su metilinta DNR tyrimas sustabdyto elektroforetinio judrumo poslinkio PAAG metodu. 0.1 nM nemetilinto (NM), hemimetilinto (HM) arba dimetilinto (DM) oligoduplekso buvo sumaišyta su įvairiais EcoRII-C kiekiais surišimo buferyje (žr. „Tyrimų metodiką“). Baltymo dimero koncentracijos surišimo mišinyje yra nurodytos virš atitinkamų takelių. Oligodupleksai su vienintele 5-metilcitozino modifikacija, įvesta tik vienoj iš taikinio CC(T/A)GG A- arba T-grandinių, pažymėti kaip HM(A) arba HM(T), atitinkamai.

Oligoduplekso karpymo tyrimai (žr. „Tyrimų metodiką“) rodo, kad abiejų citozinių metilinimas (DM) sumažina abiejų grandinių karpymo greičius beveik penkiomis eilėmis, palyginus su nemetilintu taikiniu (4 lentelė). Hemimetilintos DNR atveju greičiai sumažėja nevienodai: modifikuotos grandinės kirpimo greitis sumažėja beveik keturiomis eilėmis, tuo tarpu nemodifikuotos – tik 100-200 kartų (5 lentelė). Panašus hemimetilintos DNR grandinių karpymo greičių asimetriškumas būdingas ir REazei EcoRI [62].

5 lentelė. EcoRII-C metilintos DNR hidrolizės greičių konstantos

Oligodupleksas*	k, (s ⁻¹)	
	grandinė T	grandinė A
NM	11± 0.9**	11± 0.9**
HM(T)	5.12±0.4×10 ⁻⁴	1.01±0.13×10 ⁻¹
HM(A)	2.75±0.31×10 ⁻²	1.20±0.72×10 ⁻³
DM	8.45±0.68×10 ⁻⁵	3.97±0.34×10 ⁻⁴

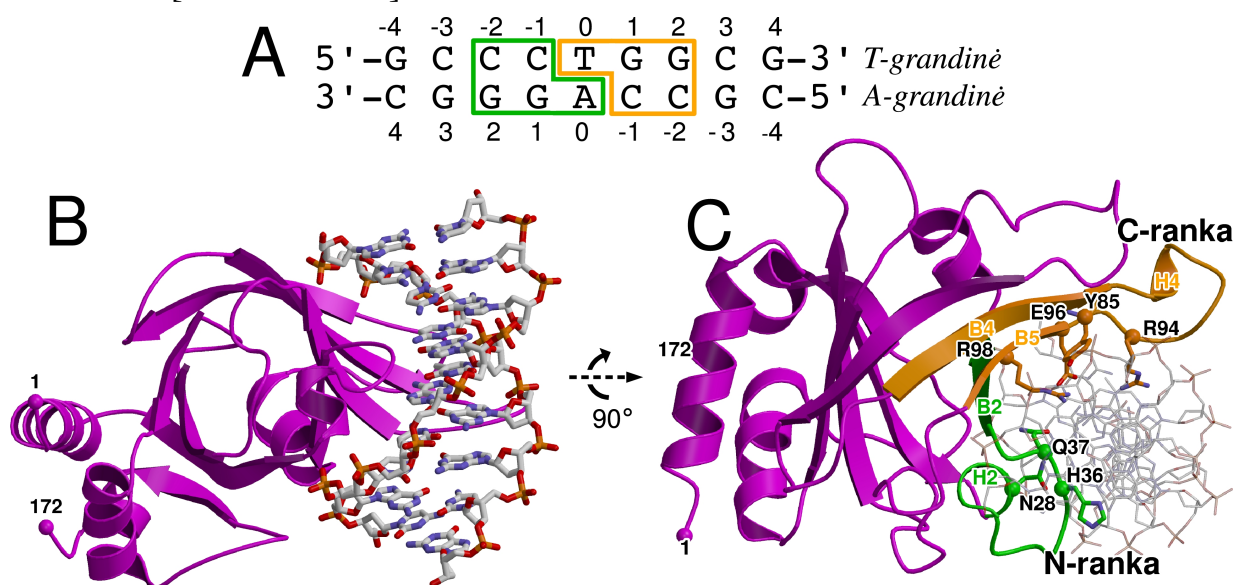
* Oligodupleksų sekos yra pateiktos 2 lentelėje. ** Kirpimo greičių konstantos pateiktos iš [50].

Struktūrinė EcoRII-C–DNR analizė rodo, kad 5-metilcitozino įvedimas *in silico* turėtų suardyti specifinę baltymo-DNR sąveiką, nes metilo grupė susidurtų su atpažinimo a.r. Asp329 (4 pav.) bei gretimu citoziniu C-2. Svarbu pažymėti, kad Asp329 suriša tos pačios DNR grandinės citozinas, kurios karpymo efektyvumas sumažėja įvedus modifikaciją, be to, ši a.r. yra tik 5 Å atstumu nuo EcoRII-C aktyvaus centro.

2. EcoRII-N domeno sąveikos su DNR tyrimai

2.1. EcoRII-N domeno struktūra su DNR

Dalinės proteolizės metodu gautas minimalus EcoRII-N domeno kompleksas su 9 bp ilgio oligonukleotidu SP9 (2 lentelė) buvo iškristalintas (žr. 3 lentelę bei „Tyrimų metodiką“). Kristalai sklaidė Rentgeno spindulius iki ~1.5 Å skiriamosios gebos, bet dėl techninių kliūčių (didelio atspindžių persidengimo) duomenis pavyko apdoroti tik iki 2.5 Å skiriamosios gebos. Duomenys EcoRII-N/SP9 surinkti DESY/EMBL (Hamburgas, Vokietija) spindulių linijoje X13 (4 lentelė). Struktūra buvo išspręsta molekulinio pakeitimo metodu, panaudojant kaip pradinį modelį apo-EcoRII baltymo atominės koordinatės [PDB ID 1NA6].



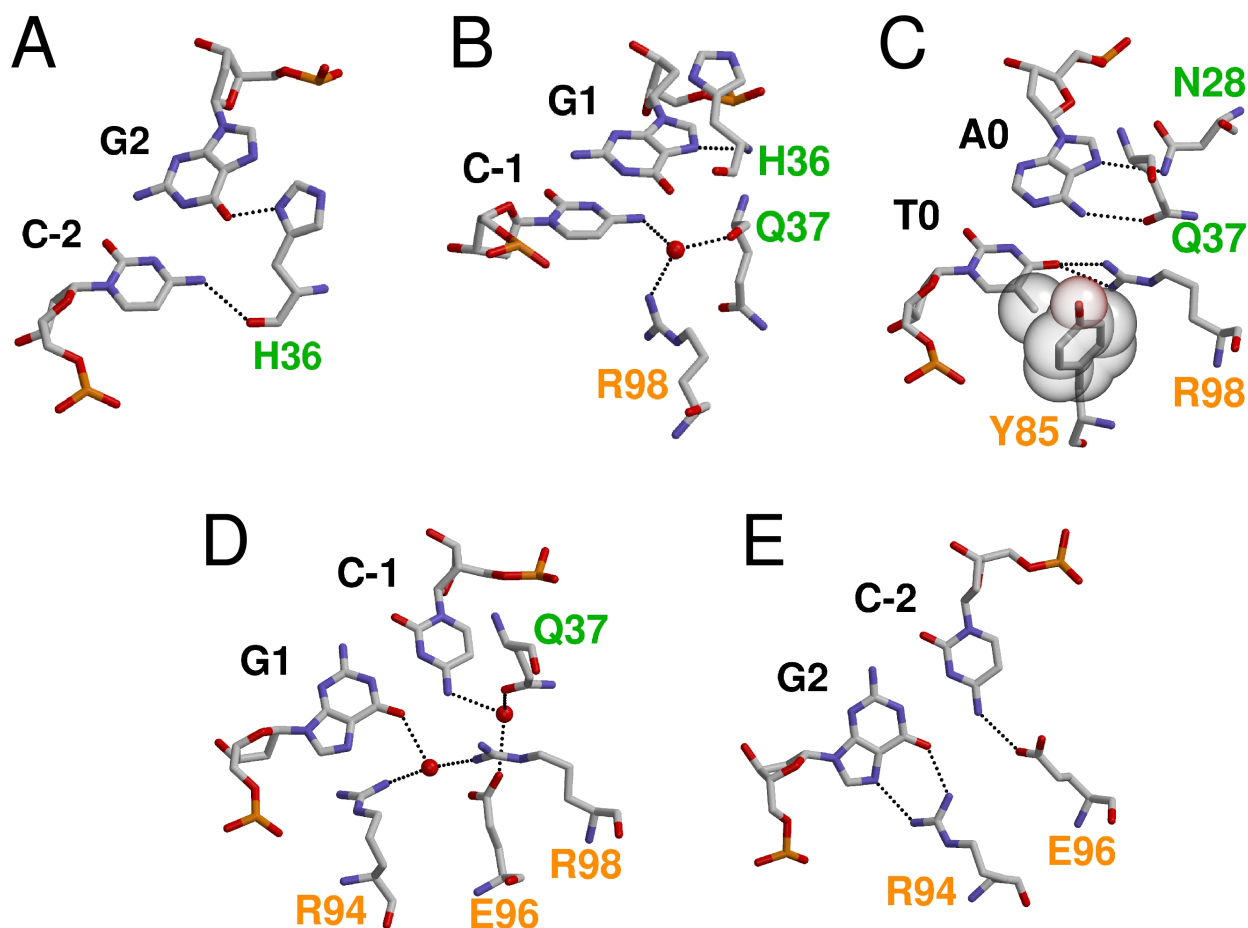
7 paveikslas. (Aprašymas kitame puslapyje)

7 paveikslas. EcoRII-N domeno komplekso su DNR struktūra. (A) Oligodupleksas, panaudotas EcoRII-N kristalinime. Atpažinimo sekos CCTGG pseudosimetrinės 5'- ir 3'-galinės dalys apibrauktos atitinkamai žalia ir oranžine spalva. (B, C) EcoRII-N–DNR kompleksas, pavaizduotas dviejose projekcijose. Antrinės struktūros elementai, atpažįstantys taikinio 5'-galinę dalį CC:GG (N-ranką), paryškinti žalia spalva; elementai, atpažįstantys 3'-galinę dalį GG:CC (C-ranką) – oranžine spalva. Specifinėje sąveikoje dalyvaujančios a.r., nuspalvintos tokiomis pat spalvomis, kaip ir struktūriniai elementai, kuriems jos priklauso, o jų C α atomų pozicijos yra pažymėtos rutuliukais.

Struktūra patikslinta prieš 2.5 Å skiriamosios gebos duomenų rinkinį (žr. „Tyrimų metodiką“; fazavimas ir patikslinimo statistika pateikti 4 lentelėje). Asimetriniame vienetė yra viena baltymo grandinė ir vienas DNR dupleksas (7 pav., dalis B). EcoRII-N domeno komplekse su DNR baltymo antrinė struktūra nesiskiria nuo EcoRII apo-formos [53], o DNR turi ~3.0 Å platesnį didįjį griovį, palyginus su kanoninės B-formos DNR. EcoRII-N–DNR komplekse yra paslėpta arti 2200 Å² baltymo-DNR sąveikos paviršiaus.

2.2. EcoRII-N taikinio CCTGG atpažinimo mechanizmas

EcoRII-N monomeras sąveikauja su atpažinimo seka vienoje orientacijoje. Domeno DNR surišimo griovys savo forma panašus į lenktą „veržliarakčio“ galvą, kuri užfiksuoja dupleksą dviem savo struktūriniais elementais – N-galine atpažinimo ranka (27-42 a.r.), sudaryta iš viena paskui kitą einančių α -spiralės H2, jungiamosios kilpos ir β -juostos B2, bei C-ranka (78-101 a.r.), sudaryta iš dviejų anti-lygiagrečių β -juostų B4, B5 ir jungiamosios kilpos (7C pav.). Abi rankos išsidėsto DNR didžiajame griovyje: atpažinimo a.r. iš N-rankos daugiausia sudaro specifinius kontaktus su taikinio „kaire“ 5'-CC:GG puse, C-rankos – su „dešine“ 5'-CC:GG. Tuo tarpu centrinės T:A bazių poros atpažinime dalyvauja abiejų rankų aminorūgštys. Detalūs baltymo-DNR specifiniai kontaktai yra pavaizduoti 8 paveiksle.



8 paveikslas. EcoRII-N taikinio 5'-CCTGG atpažinimas. (A-E) Atskirų bazių porų vaizdai yra išdėstyti sekant T-grandinę (7A pav.) 5' → 3' kryptimi. DNR ir a.r. yra nuspalvinti pagal CPK schemą; N- ir C- rankų a.r. paženklintos atitinkamai žalia ir oranžine spalvomis. Vandenilinės jungtys pavaizduotos juodu punktyru, vandens molekulės – raudonais rutuliukais.

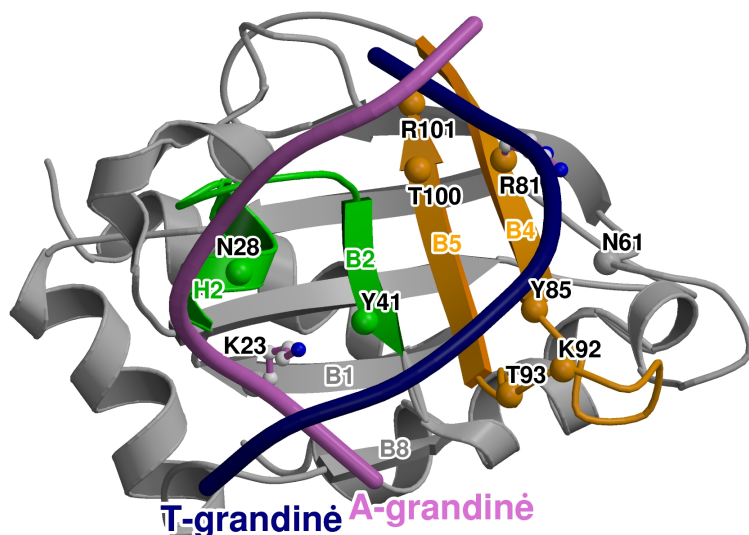
C-2:G2 His36 pagrindinė grandinė sudaro vandenilinę jungtį su citozino N4 atomu, o šoninės grandinės imidazolo žiedas – su guanino O6 atomu (8A pav.).

C-1:G1 Arg98 guanidino grupė bei Gln37 pagrindinės grandinės deguonies atomas sudaro netiesioginę vandenilinę jungtį su citozino N4 atomu; His36 pagrindinis grandinės azoto atomas – su guanino N7 atomu (8B pav.).

T0:A0 Gln37 ir Asn28 šoninės grandinės sudaro vandenilines jungtis su adenino N6 ir N7 atomais, atitinkamai; Arg98 – su timino O4 atomu. Tyr85 aromatinis žiedas sudaro van der Valso kontaktą su timino metilo grupe (8C pav.).

G1:C-1 Arg94 ir Arg98 šoninės grandinės sudaro netiesioginę vandenilinę jungtį su guanino O6 atomu, Glu96 ir Gln37 šoninės grandinės – su citozino N4 atomu (8D pav.).

G2:C-2 Arg94 šoninė grandinė sudaro vandenilines jungtis su guanino N7 ir O6 atomais; Glu96 šoninė grandinė - su citozino N4 atomu (8E pav.).



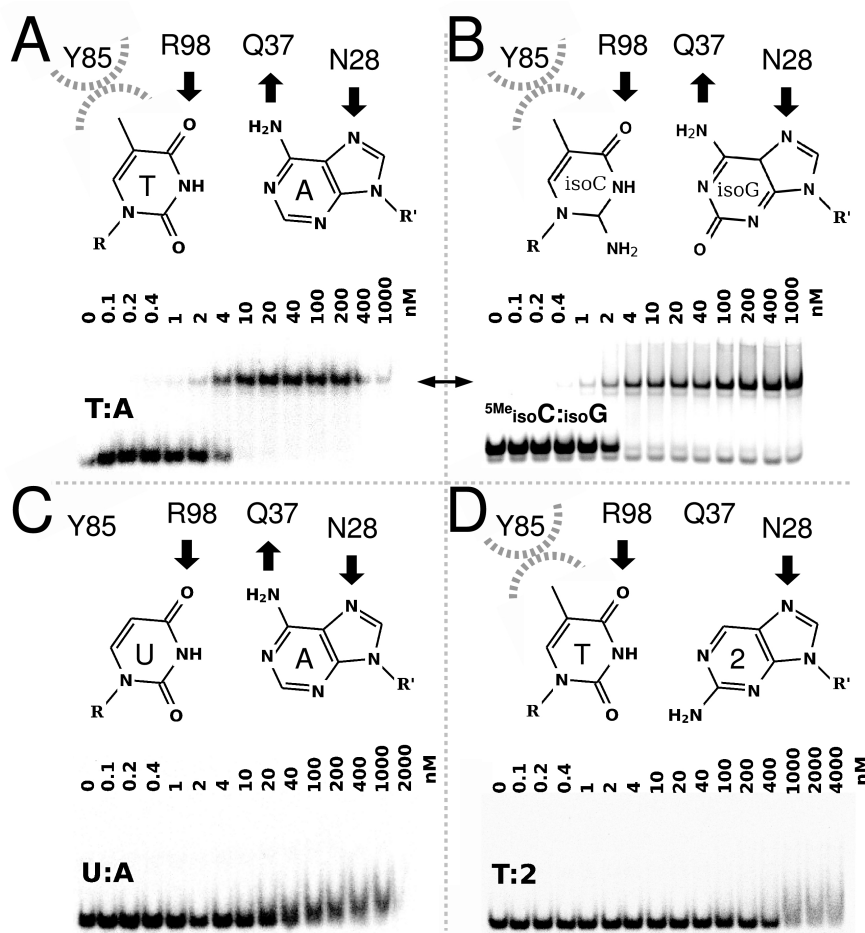
9 paveikslas. EcoRII-N nespecifinė sąveika su DNR.

Amino rūgščių, sudarančių kontaktus su DNR fosfodiesteriniu karkasu, $C\alpha$ atomų pozicijos parodytos kaip sferos. EcoRII-N specifinio atpažinimo N- ir C-rankos nuspalvintos žalia ir oranžinė spalvomis, atitinkamai; likusi baltymo dalis nuspalvinta pilkai. Parodytos Lys23 ir Arg81 liekanų šoninės grandinės, kurios sudaro konservatyvius nespecifinius kontaktus su atpažinimo sekos 5'-galiniais nukleotidais A- ir T-grandinėse, atitinkamai.

Įdomu tai, kad atpažinimo rankų a.r. sudaro nespecifinius kontaktus tik su viena DNR grandine: N-rankos Asn28 ir Tyr41 sąveikauja su A-grandinės fosfodiesteriniu karkasu, o C-rankos Arg81, Tyr85, Lys92, Thr93, Thr100 ir Arg101 – su T-grandinės karkasu (9 pav.).

2.3. Specifinių kontaktų su taikinio centre T:A bazių pora tyrimas

Taikinio CCTGG simetrinį CC:GG dinukleotidų atpažinimo būdą suardo centrinės T:A bazių poros atpažinimo determinančių asimetriškumas. Alternatyvi taikinio orientacija atpažinimo rankų atžvilgiu suardytą van der Valso kontaktą tarp timino ir Tyr85 bei vandenilinę jungtį tarp adenino Gln37 (8C pav.). Siekiant atskirai patikrinti minėtų kontaktų svarbą baltymo-DNR sąveikai buvo nuspręsta atlikti DNR surišimo eksperimentus panaudojant modifikuotą oligodupleksą, kuriame timinas pakeistas uridinu (10C pav.) arba adeninas – 2-aminopurinu (10D pav.). Atlikus DNR surišimo tyrimą (žr. „Tyrimų metodiką“) paaiškėjo, kad EcoRII-N domeno sąveika su šiais modifikuotais oligodupleksais nėra stebima. Šie duomenys pavirtina, kad Gln37 ir Tyr85 kontaktai su centrine bazių pora yra kritiškai svarbūs EcoRII-N domeno sąveikai su DNR. Pažymėtina, kad abi a.r. yra griežtai konservatyvios EcoRII šeimoje. Įdomu tai, kad baltymo-DNR sąveiką su centrine bazių pora galima išlaikyti pateikiant tokią 5-metilcitozinu bei izoguaninu modifikuotą DNR, kuri didžiajame griovyje turi visas keturias T:A bazių porai būdingas sąveikos grupes (plg. 10 pav. A ir B dalis).



10 paveikslas. EcoRII-N domeno specifinių kontaktų su centrinė takinio bazių pora tyrimas.

Hidrofobinis kontaktas pavaizduotas pilka punktyrine linija, vandenilinės jungtys – juodom rodyklėm akceptoriaus kryptimi. Radioaktyvia žyme žymėta natyvi arba modifikuota DNR (2 lentelė) sumaišyta su skirtingų koncentracijų (nurodytos virš atitinkamų takelių) EcoRII-N domeno tirpalais ir pavyzdžiai analizuoti, vykdant PAAG forezę natyviomis sąlygomis (žr. „Tyrimų metodika“)

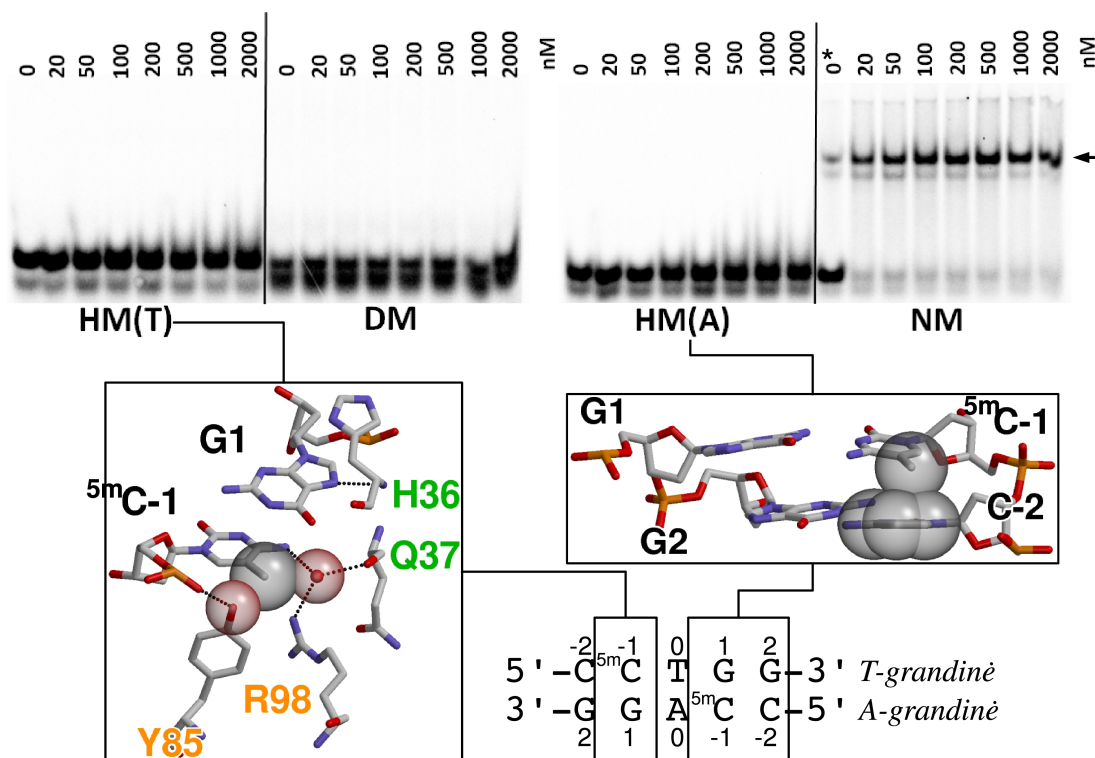
Stebimas kristale EcoRII-N DNR atpažinimo asimetriškumas atitinka susiuvimo eksperimentų rezultatus, kurie parodė, kad Tyr41 geba kovalentiškai prisijungti prie A-grandinės citozino C-2, bet su T-grandine susiuvimo pastebėta nebuvo [63].

2.4. EcoRII-N jautrumo metilinimui bei ir netiesioginio atpažinimo tyrimai

EcoRII-N–DNR komplekso bioinformatinė analizė rodo, kad A-grandinėje citozino C-1 pakeitimas į 5-metilcitoziną suardytų netiesioginį specifinį kontaktą (8D pav.) bei sudarytų sterinius trukdžius gretimam citozinui C-2 (11 pav.). T-grandinėje 5-metilcitozino įvedimas sudarytų sterinius trukdžius Tyr85 liekanai, turinčiai ir specifinius (8C pav.), ir nespecifinius (11 pav.) kontaktus su DNR. DNR surišimo eksperimentai rodo, kad citozinių C-1 metilinimas C5 pozicijoje bet kurioje iš A- arba T-grandinių visiškai panaikina EcoRII-N sąveiką su hemimetilinta DNR (11 pav.). Taigi EcoRII-N domenas yra labiau jautrus hemimetilinimui negu EcoRII-C, kas paaiškina ankščiau atliktų EcoRII jautrumo metilinimui tyrimus [61].

Siekiat patikrinti, ar baltymo-DNR kontaktai per vandens molekules yra svarbūs specifinei sąveikai (8BD pav.), buvo atlikti DNR surišimo eksperimentai panaudojant modifikuotus oligodupleksus su nepakeista didžiojo griovio geometrija, bet su sukeistomis atpažinimo determinantėmis (2 lentelė, dupleksai A:U ir U:A). Paaiškėjo, kad EcoRII-N domenas nesąveikauja su DNR, turinčia taikinio antroje (C-1:G1 bazių

pora 7 paveikslo A dalyje) arba ketvirtoje pozicijoje (G1:C-1 bazių pora 7 paveikslo A dalyje) adeniną vietoj guanino ir uridiną vietoj citozino (duomenys neparodyti).



11 paveikslas. EcoRII-N domeno bioinformatinė bei biocheminė jautrumo metilinimui analizė.

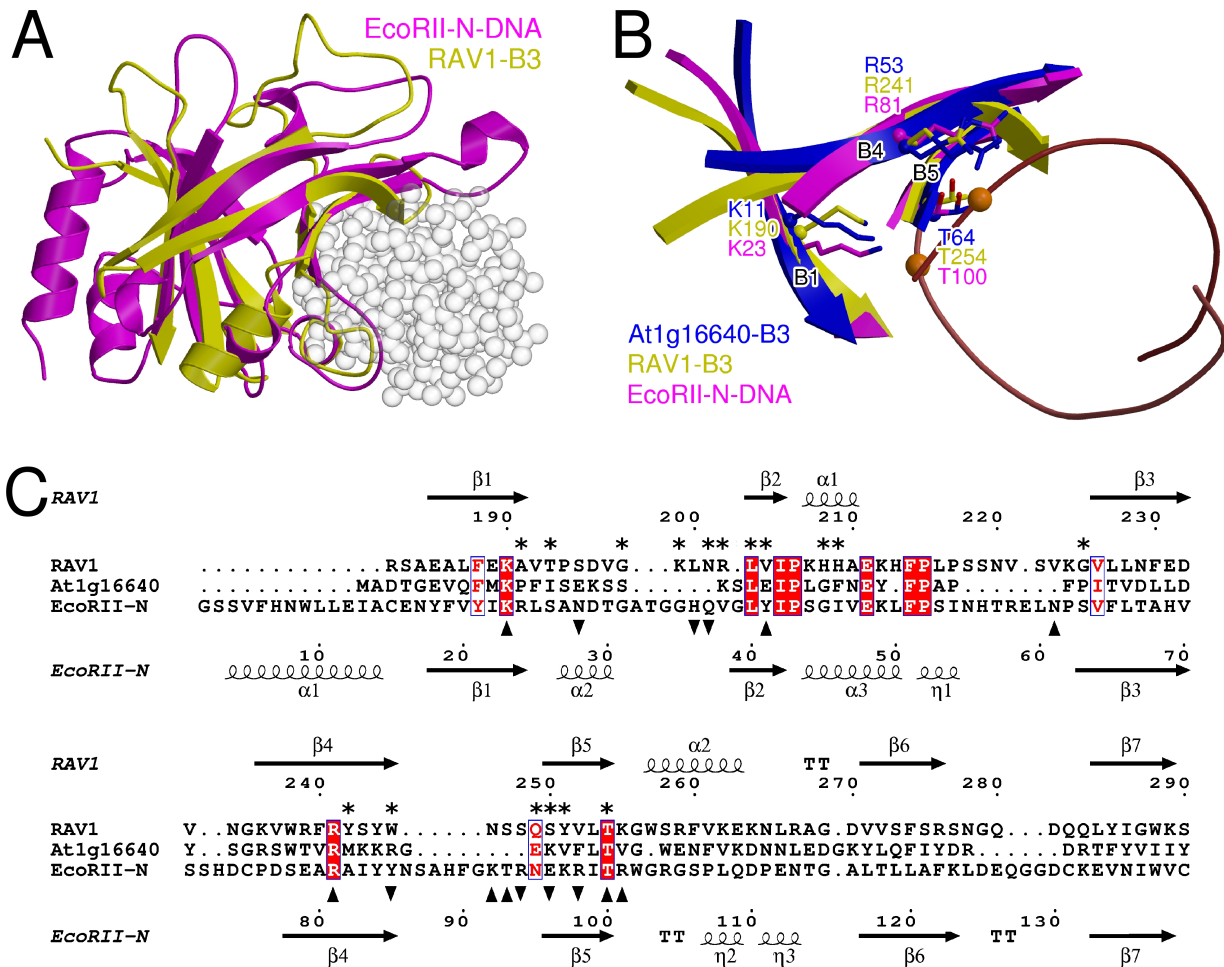
Radioaktyvia žyme pažymėta nemetilinta (NM), dimetilinta (DM) arba hemimetilinta (HM(A) ir HM(T)) DNR (2 lentelė) sumaišyta su EcoRII-N ir pavyzdžiai buvo analizuoti atliekant elektroforezę PAAG esant natyviomis sąlygomis (žr. „Tyrimų metodika“). Hemimetilintų oligodupleksų žymėjimas – kaip 6 paveiksle. Baltymo koncentracijos nurodytos virš atitinkamų takelių, rodyklė žymi specifinį baltymo-DNR kompleksą. Žemiau yra pateikti *in silico* 5-metilcitozino modeliavimo rezultatai EcoRII-N–DNR komplekso struktūroje, atlikti COOT [42] programa. Sferomis paryškinti atomai, esantys pernelyg arti sumodeliuotos metilo grupės (arčiau, nei atomų van der Valso spindulių suma). * – į takelį pakliuvo dalis pavyzdžio iš gretimo takelio.

2.5. Panašumas į kitus B3 sanklodos baltymus

BMR analizė atskleidė, kad panašią į EcoRII-N struktūrinę sanklodą turi B3 transkripcijos reguliatorių šeimai priklausančių baltymų RAV1 [64] ir At1g16640 [65] DNR surišantys domenai. Abiejų domenų struktūroms programa DALI [66] randa gan aukštą panašumo į EcoRII-N Z-įvertį (>6). Filogenetinė analizė taip pat rodo, kad visi trys baltymai yra glaudžiai evoliuciškai susiję [64][67].

Struktūrinis EcoRII-N–DNR ir RAV1-B3 domeno sugretinimas leidžia iškelti hipotezę, kad visi domenai, turintys atviros β -statinės sanklodą, gali surišti DNR panašiu būdu. Tokiame gretinyje RAV1 baltymo struktūriniai elementai išsidėsto DNR didžiajame griovyje, nesudarydami didelių sterinių trukdžių. Pažymėtina, kad, RAV1 DNR surišimo griovys susideda iš antrinių struktūrų, analogiškų EcoRII-N atpažinimo

N- ir C-rankoms (12 pav., dalys A ir C). Be to, RAV1 a.r. Lys190, Thr193, Arg241 (12B pav.) bei Ser195 ir Thr254 yra arti DNR fosfodiesterinio karkaso.



12 paveikslas. Panašumai tarp EcoRII-N ir augalų B3 šeimos transkripcijos veiksnių. (A) RAV1-B3 transkripcijos veiksnio (geltonas) [PDB ID 1WID] struktūros sugretinimas su EcoRII-N–DNR kompleksu (avietinis). DNR atomai pavaizduoti šviesiai pilkomis sferomis. (B) Pavaizduotos sanklodai būdingos β-juostos EcoRII (avietinės), RAV1-B3 (geltonos) bei At1g16640 [PDB ID 1YEL] (mėlynos) baltymuose, kuriose išsidėsto sanklodoje konservatyvios a.r., sudarančios kontaktus su DNR A- ir T-grandinių fosfatais (oranžinės sferos) EcoRII-N–DNR komplekse. DNR pavaizduota kaip ruda spiralė. (C) Struktūrinis B3 domenų ir EcoRII-N sugretinimas pavaizduotas a.r. sekų lygyje. RAV1-B3 ir EcoRII-N antrinės struktūros elementai yra parodyti virš ir po palyginio, atitinkamai. EcoRII-N a.r., sąveikaujančios su DNR, pavaizduotos trikampaiais: smailė į apačią žymi specifinį kontaktą su baze, smailė į viršų – nespecifinį kontaktą su fosfatu. Žvaigždutės žymi RAV1-B3 a.r., kurių BMR signalas yra labiausiai veikiamas atliekant titravimo specifine DNR eksperimentus [64].

BMR titravimo eksperimentas leido prognozuoti, kurios RAV1 a.r. sąveikauja su DNR [64], ir daugelis jų sutampa su identifikuotomis iš struktūrinio palyginimo su EcoRII-N (12C pav.). EcoRII-N a.r. Lys190, Arg241 bei Thr254 (visiškai konservatyvios EcoRII šeimoje) yra struktūriškai konservatyvios RAV1-B3 ir At1g16640 (12B pav.), o taip pat ir kitose B3 transkripcijos veiksnių šeimose, išskyrus ABI (6 lentelė). Toks nespecifinės sąveikos determinančių konservatyvumas leidžia tikėtis tos pačios DNR orientacijos EcoRII-N ir RAV1-B3 kompleksuose.

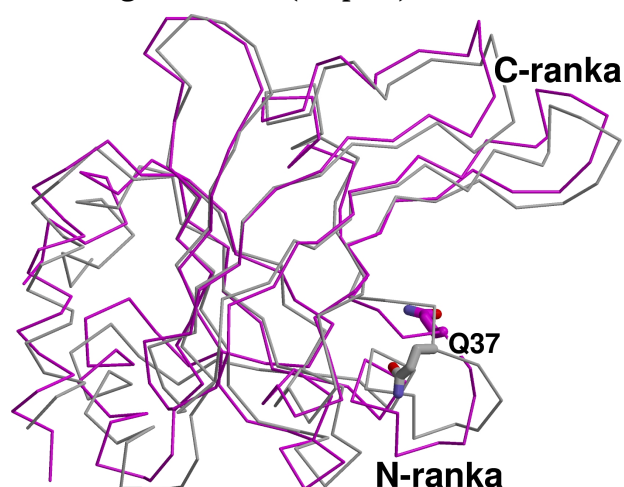
6 lentelė. Konservatyvios EcoRII a.r., sąveikaujančios su DNR fosfodiesteriniu karkasu bei jų struktūriniai analogai B3 šeimos baltymuose

Baltymo domenas:	EcoRII-N	RAV1-B3	ARF1-B3*	ABI3-B3*	At1g16440-B3
Atpažinimo seka	CCTGG	CACCTG	TGTCTC	CATGCA	NS**
Struktūriškai konservatyvios aminorūgštys	K23 R81 T100	K190 R241 T254	K160 R211 T224	K574 R623 E639	K11 R53 T64

* nuspėtų struktūrų koordinatės iš [64]. NS** – nespecifiškai su DNR sąveikaujantis baltymas.

3. EcoRII veikimo modelis

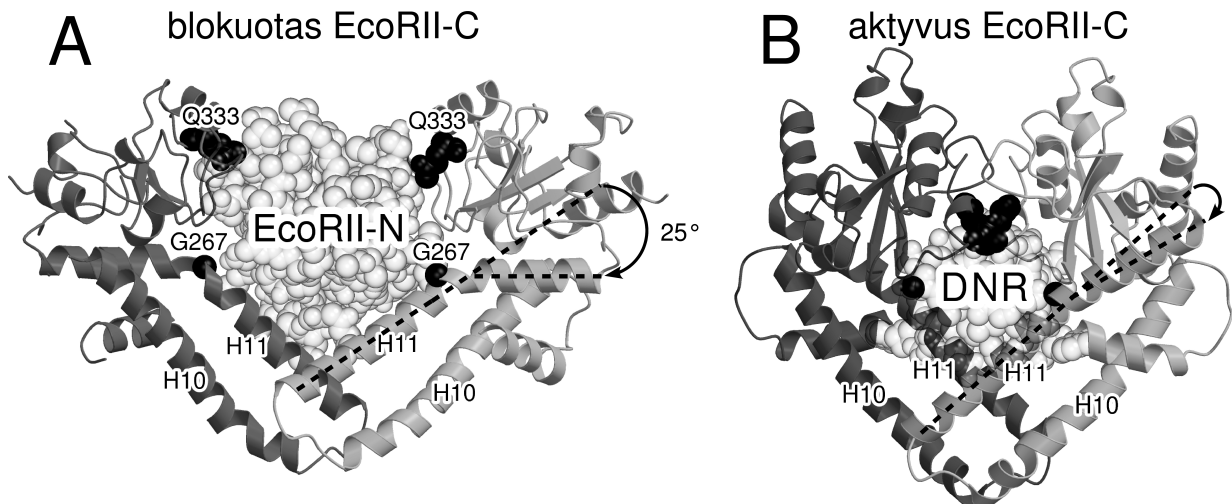
Apo struktūroje EcoRII C-galinis nukleazinis domenas yra erdviškai blokuotas dviem N-galiniais domenais (autoinhibicija) (14A pav.). Atskirų EcoRII-N ir -C domenų struktūros su DNR iliustruoja pokyčius, kurie gali būti svarbūs pilno ilgio EcoRII aktyvacijai, kai C-galinis domenas geba surišti ir perkirpti DNR. Pirmiausiai autoinhibuotas EcoRII gali surišti DNR N-galiniais domenais. Struktūrinė analizė atskleidė, kad surišant DNR EcoRII-N atpažinimo rankų pokyčiai yra minimalūs ir daugiausiai liečia kilpas. C-rankos kilpa pajuda 3 Å, užtikrindama specifinį kontaktą su taikiniu per Arg94, tuo tarpu N-rankos kilpa keičia savo konformaciją, dėl ko į DNR surišimo griovį vietoj Val38 yra pateikiama taikinio atpažinime dalyvaujanti aminorūgštis Gln37 (13 pav.).



13 paveikslas. EcoRII-N domeno pokyčiai surišant DNR. Domeno iš EcoRII-N-DNR komplekso struktūros (avietinė) sugretinimas su domeno iš apo EcoRII struktūra (pilka). Pavaizduota šoninė grandinė Gln37, kuri dėl konformacinių pokyčių N-ranke atsiduria DNR surišimo paviršiuje ir dalyvauja specifinėje sąveikoje su taikiniu CCWGG (detalūs kontaktai pateikti 8 paveikslo dalyse B, C ir D).

Struktūrinis sugretinimas rodo, kad EcoRII N-galinio domeno surišta efektorinė DNR atsiremtų į to paties monomero C-galinį katalitinį domeną (neparodyta). Taigi tam, kad iš nukleazinio domeno DNR surišimo griovio būtų pašalinti abu efektoriniai N-galiniai domenai, pastarieji turi surišti po CCWGG taikinį. Pašalinus inhibiciją, išlaisvintas EcoRII C-galinis domenas turi persitvarkyti tam, kad surišų DNR: N-galinis dimerizacijos paviršius dėl α -spiralių H10/H11 pasislinkimo nežymiai padidėja nuo 1400 Å² iki 1600 Å², o inhibuotoje formoje sulenкта α -spirale H11 turi išsitiesinti (14 pav.). Tokie monomero bei dimero persitvarkymai leidžia konservatyvioms atpažinimo spiralėms H14 suartėti, dėl ko C-galinis domenas sugeba apgauti ir perkirpti trečią DNR kopiją (EcoRII-C domeno dimerizacija ant DNR aprašyta dalyje 1.2.).

Siūlomas EcoRII aktyvacijos mechanizmas puikiai dera su ankščiau pasiūlytu trijų taikinių surišimo modeliu: sutartina abiejų taikinio DNR grandinių hidrolizė vyksta tik tuo atveju, kai abu N-galiniai domenai suriša po vieną DNR kopiją [68]. Be to, atominės jėgos mikroskopijos metodo pagalba buvo parodyta, kad EcoRII geba sudaryti kompleksus, kuriuose baltymas suriša tris CCWGG taikinius ištisinėje DNR molekulėje [32]. Ankščiau atlikta mutacinė EcoRII analizė taip pat palaiko siūlomą EcoRII aktyvacijos mechanizmą, nes buvo parodyta, kad efektoriniame N-galiniame domene aminorūgščių Glu96 arba Arg98 (specifiniai kontaktai parodyti 8 paveikslo dalyse B, C, D) pakeitimas į alaniną panaikino fermento aktyvumą [53].

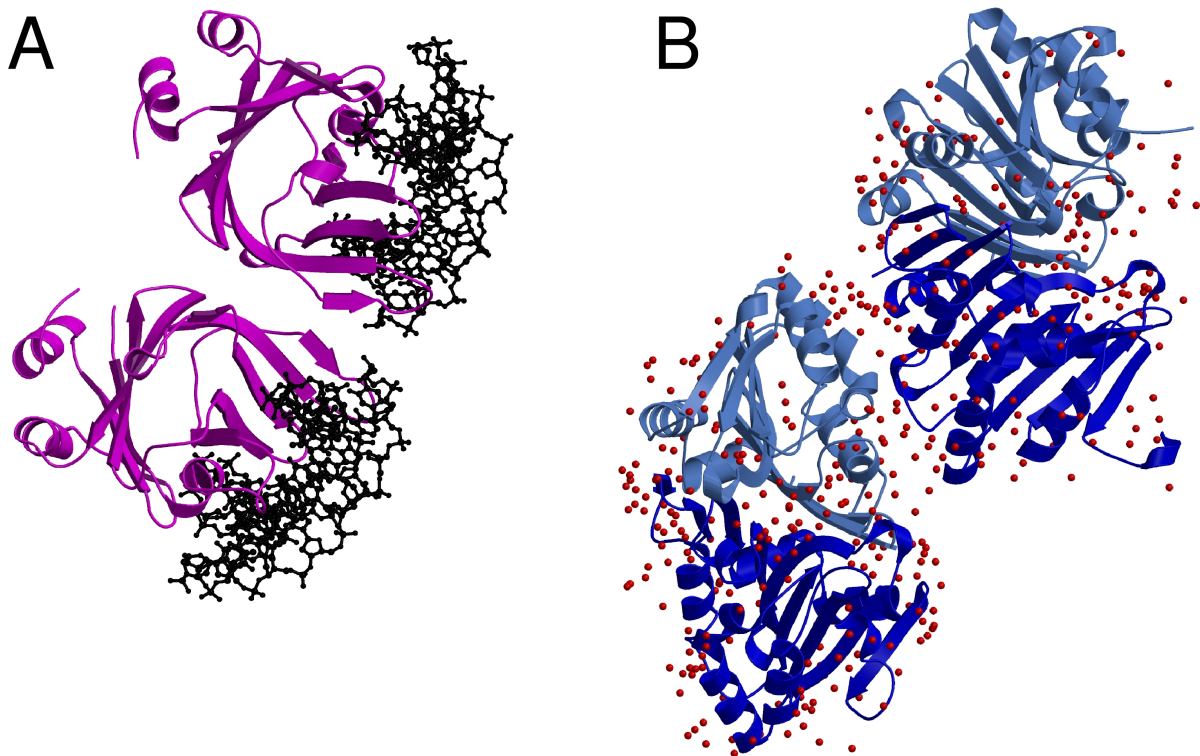


14 paveikslas. EcoRII-C domeno pokyčiai surišant DNR. (A) Apo-EcoRII struktūroje dimerinis katalitinis C-galinis domenas (šviesiai ir tamsiai pilkas) yra erdviškai blokuotas N-galinių domenų, o pašalinus N-galinius domenų EcoRII-C geba surišti DNR. N-galinis domenas parodytas pilkomis sferomis. (B) Abiejose struktūrose ilgosios α -spirālės H11 ašis parodyta juoda punktyrine linija, juodomis sferomis pavaizduoti Gly267 C α atomo bei Gln333 atomų pozicijos. DNR parodyta pilkomis sferomis.

4. BfiI domenų sąveikos su DNR tyrimai

4.1. BfiI N- ir C-galinių domenų kristalinimas su DNR

BfiI katalitinis mutantas K107A buvo sumaišytas su 12 bp ilgio oligonukleotidu S12 (2 lentelė) ir dalinės proteolizės metodu gauti BfiI-C–DNR kompleksas bei BfiI-N-K107A domenas. Kompleksas ir domenas buvo išgryninti, kaip aprašyta „Tyrimo metodikoje“. BfiI-C–DNR kompleksas, o taip pat BfiI-K-107A domenas su NS8 oligodupleksu buvo iškristalinti (žr. 3 lentelę bei „Tyrimų metodiką“). BfiI-C–DNR ir BfiI-N-107A kristalai sklaidė Rentgeno spindulius iki ~ 3.0 Å ir 2.5 Å skiriamosios gebos, atitinkamai. Rentgeno spindulių difrakcijos duomenų rinkiniai BfiI-C/S12 bei BfiI-N-K107A/NS8 surinkti su Rigaku difraktometru (4 lentelė).

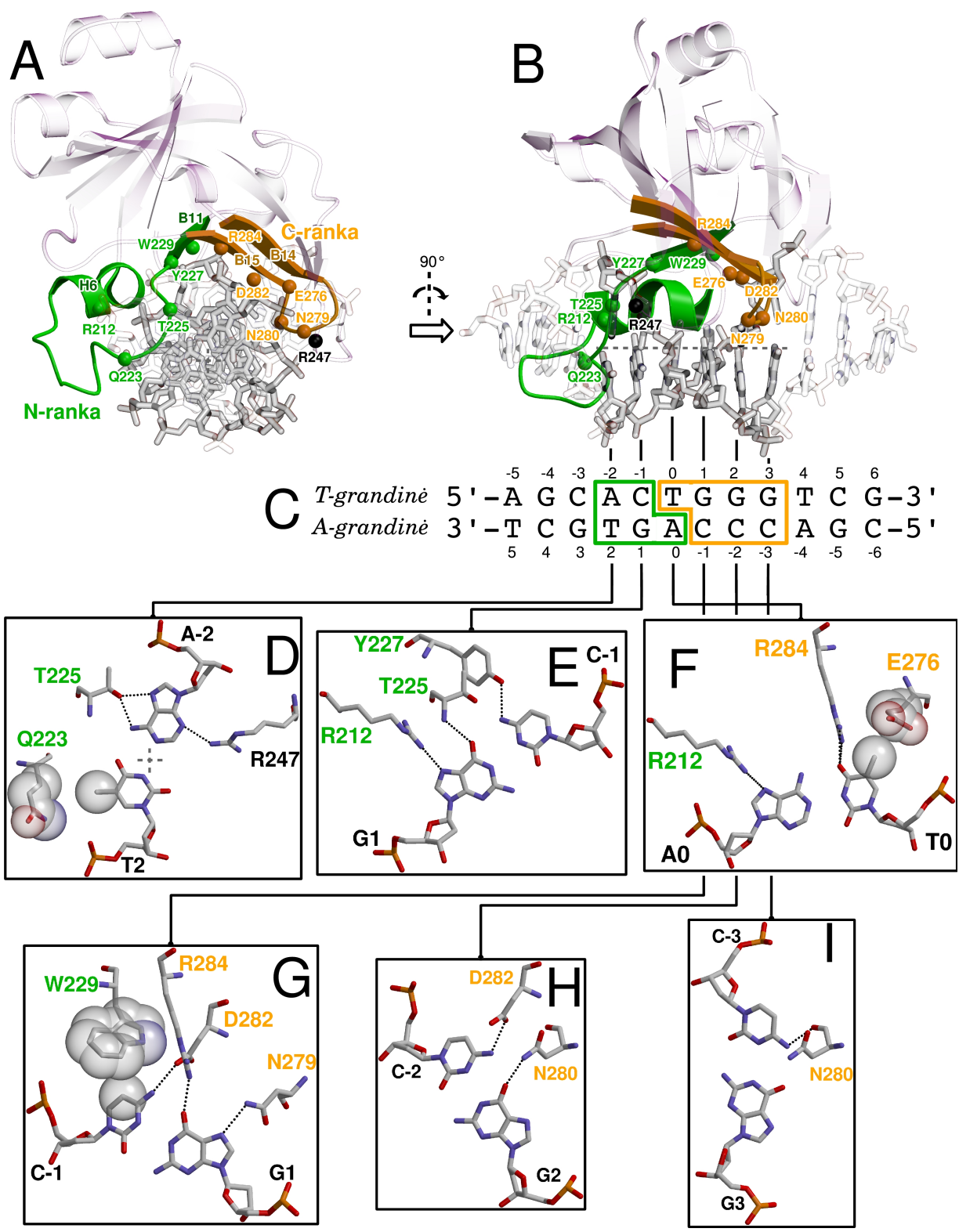


15 paveikslas. Asimetrinio vieneto sudėtis kristaluose. (A) BfiI-C–DNR asimetrinis vienetas. DNR nuspalvinta juoda spalva, baltymas – avietine. (B) BfiI-N-K107A asimetrinis vienetas. Baltymas pavaizduotas tamsiai ir šviesiai mėlyna spalvomis, vandens molekulės nuspalvintos raudonai.

Struktūros buvo išspręstos molekulinio pakeitimo metodu, kaip pradinį modelį panaudojant apo BfiI atomines koordinatas, ir palaipsniui patikslinant iki parametų, tinkamų detaliai struktūrų analizei (žr. „Tyrimų metodiką“, fazavimo ir patikslinimo statistika pateikti 4 lentelėje). BfiI-C kristalo asimetriniame vienete yra du baltymo monomerai (a.r. 193-358), kiekvienas surišęs po vieną B-formos oligodupleksą (15A pav.). BfiI-N-K107A kristalo asimetriniame vienete yra du N-galinio domeno dimerai (a.r. 1-189), kurių DNR surišimo griovyje elektroninio tankio, būdingo DNR, aptikti nepavyko (15 pav.).

4.2. BfiI-C sąveikos su specifine DNR mechanizmas

BfiI-C DNR surišimo paviršius savo forma yra labai panašus į EcoRII-N. Surišimo paviršių sudarančios atpažinimo rankos išsidėsto DNR didžiame griovyje (16 pav.). Skirtingai nei EcoRII-N, BfiI-C kontaktuoja su DNR iš mažojo griovio pusės per N- ir C-galines kilpas (17 pav.). BfiI-C atpažinimo N-ranka (a.r. 210-231) yra sudaryta iš α -spirалės H6, β -juostos B11 bei jungiančiosios kilpos. Dvi antilygiagrečios β -juostos B14, B15 ir jungianti jas kilpa sudaro atpažinimo C-ranką (a.r. 266-287) (16 pav.).



16 paveikslas. (Aprašymas kitame puslapyje)

16 paveikslas. BfiI-C sąveikos su specifine DNR mechanizmas. (A, B) Bendras BfiI-C–DNR komplekso vaizdas (A) išilgai ir (B) statmenai ilgosios DNR ašies (pilka punktyrinė linija). BfiI-C antrinės struktūros elementai, atpažįstantys taikinio 5'-galinę dalį (N-rankos dalys), paryškinti žalia spalva, atpažįstantys 3'-galinę dalį (C-rankos dalys) – oranžine spalva, kitos baltymo dalys pavaizduotos pilkai. Tomis pačiomis spalvomis pavaizduoti specifinėje sąveikoje dalyvaujančių a.r. C α atomai, kurių pozicijos pažymėtos rutuliukais. (C) Atpažinimo sekos ACTGGG bazės, sudarančios vandenilines jungtis su atpažinimo N- arba C-rankomis, apibrauktos žaliu arba oranžiniu kontūrais, atitinkamai. (D-I) Atskirų bazių porų atpažinimo vaizdai (komplekso orientacija kaip A dalyje) yra išdėstyti sekant T-grandinę 5' → 3' kryptimi. DNR ir a.r. nuspalvintos pagal CPK schemą, a.r. vardų spalvos atitinka naudojamas paveikslo A dalyje. Vandenilinės jungtys pavaizduotos juodu punktyru, tekste minimų arti vienas kito esančių atomų van der Valso paviršiai parodyti kaip pilkos sferos.

Kaip ir EcoRII-N–DNR komplekse, BfiI-C N-galinė bei C-galinė atpažinimo rankos sąveikauja su atpažinimo sekos 5'- ir 3'-galu (16C pav.).

A-2:T2 Thr225 šoninė grandinė sudaro dvi vandenilines jungtis su adenino N7 bei N6 atomais. Taip pat galimas Gln223 šoninės grandinės van der Valso kontaktas su timino metilo grupe. Iš mažojo griovio pusės N-kilpos Arg247 šoninė grandinė gali sudaryti vandenilinę jungtį su adenino N3 atomu (16D pav.).

C-1:G1 Tyr227 šoninė grandinė sudaro vandenilinę jungtį su citozino N4 atomu, o Thr225 pagrindinė grandinė bei Arg212 šoninė grandinė – su guanino O6 ir N7 atomais, atitinkamai (16E pav.).

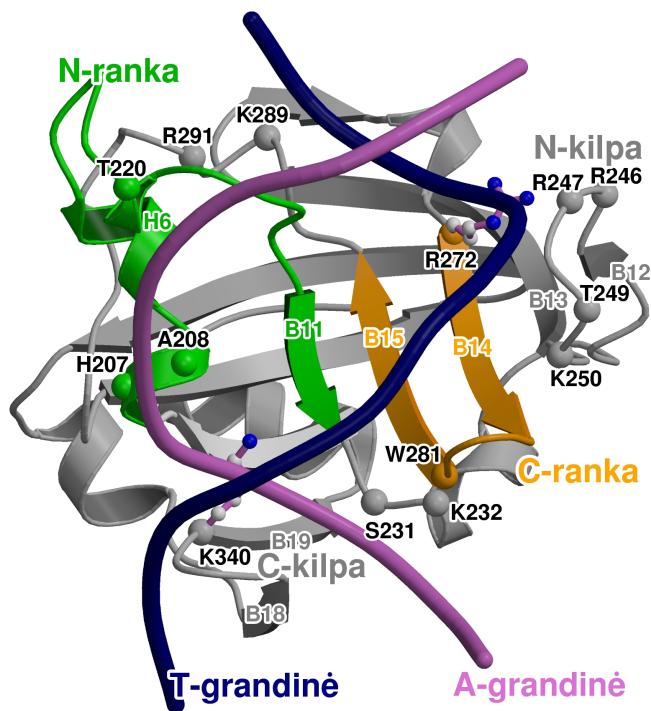
T0:A0 Arg284 šoninė grandinė sudaro vandenilinę jungtį su timino O4 atomu. Glu276 šoninė grandinė sudaro van der Valso kontaktą su timino metilo grupe (16F pav.). Arg212 šoninė grandinė gali sudaryti vandenilinę jungtį su adenino N7 atomu.

G1:C-1 Arg284 ir Asn279 šoninės grandinės sudaro vandenilines jungtis su guanino O6 ir N7 atomais, atitinkamai. Asp282 sudaro vandenilinę jungtį su citozino N4 atomu, o Trp229 šoninė grandinė sudaro van der Valso kontaktą su citozino C5 atomu (16G pav.).

G2:C-2 Asn280 šoninė grandinė sudaro vandenilinę jungtį su guanino O6 atomu, o Glu282 šoninė grandinė – su citozino N4 atomu (16H pav.).

G3:C-3 Asn280 pagrindinė grandinė sudaro vandenilinę jungtį su citozino N4 atomu (16I pav.).

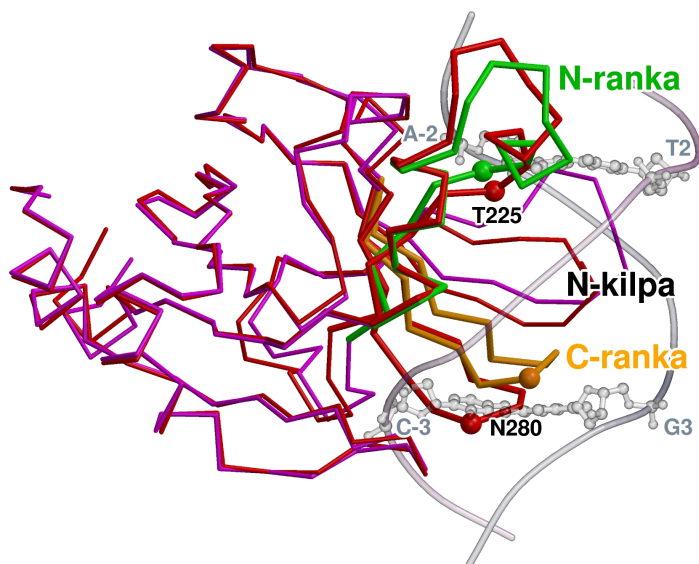
BfiI ir į ją panašių baltymų a.r. sekų palyginys (nepateikta) parodė, kad visos komplekso struktūroje identifikuotos specifinės sąveikos a.r. (išskyrus Gln223) yra griežtai konservatyvios. Baltymo-DNR komplekse oligodupleksas yra užfiksuojamas skirtingų struktūrinių elementų: T-grandinės fosfodiesterinis karkasas yra surištas a.r. iš C-rankos ir N-kilpos bei Lys289 ir Arg291, o A-grandinė turi nespecifinių kontaktų su a.r. iš N-rankos bei C-kilpos.



17 paveikslas. BfiI-C kontaktai su specifinės DNR fosfodiesteriniu karkasu.

Sferomis parodytos aminorūgščių, sudarančių kontaktus su DNR fosfodiesteriniu karkasu, C α atomų pozicijos. BfiI-C specifinio atpažinimo N- ir C-rankos nuspalvintos žalia ir oranžinė spalvomis, atitinkamai, likusi baltymo dalis nuspalvinta pilkai. Yra parodytos šoninės a.r. Lys340 ir Arg272 grandinės, kurios sudaro sanklodai būdingus nespecifinius kontaktus su atpažinimo sekos nukleotidais A- ir T-grandinėse, atitinkamai. Baltymo-DNR kompleksas yra atvaizduotas tokioj pat orientacijoje kaip ir 9 paveiksle.

BfiI ir į ją panašių baltymų a.r. sekų palyginys (nepateikta) parodė, kad visos komplekso struktūroje identifikuotos specifinės sąveikos a.r. (išskyrus Gln223) yra griežtai konservatyvios. Baltymo-DNR komplekse oligodupleksas yra užfiksuojamas skirtingų struktūrinių elementų: T-grandinės fosfodiesterinis karkasas yra surištas a.r. iš C-rankos ir N-kilpos bei Lys289 ir Arg291, o A-grandinė turi nespecifinių kontaktų su a.r. iš N-rankos bei C-kilpos.



18 paveikslas. Struktūriniai BfiI C α karkaso pokyčiai surišant DNR.

Sugretinime BfiI-C iš apo struktūros [PDB ID 2C1L] yra nuspalvintas raudonai, o komplekse su DNR – avietine spalva. Atpažinimo N- ir C-rankos komplekse su DNR yra paryškintos žalia bei oranžinė spalvomis, atitinkamai. Sferomis yra pažymėti C α atomai iš tų a.r., kurių pagrindinės grandinės sudaro specifinius kontaktus su DNR. DNR pavaizduota kaip pilka skaidri spiralė, taikinio pirmos ir paskutinės bazių poros yra pažymėtos rutuliukais ir strypeliais (*angl.* „ball-and-stick“).

BfiI-C–DNR struktūros sugretinimas su apo-BfiI koordinatėmis parodė, kad bendra β -statinės konformacija surišant DNR beveik nesikeičia, bet skiriasi atpažinimo N- ir C-rankų, bei C-kilpos pozicijos (18 pav.). Atpažinimo N-ranka pajuda 4 Å bei kažkiek susilanksto (18 pav.), sudarydama galimybę Thr225 užmegzti specifinius kontaktus su taikinio pirma ir antra bazių pora (16 pav., dalys D ir E). Kitų taikinio 5'-galą

atpažįstančių a.r. šoninių grandinių konformacijos, įskaitant Arg212, Tyr227 ir Trp229, keičiasi labai nežymiai (gretinys neparodytas). Atpažinimo C-ranka β -statinės atžvilgiu pajuda 4 Å (18 pav.) ir per Asn280 pagrindinę grandinę sudaro specifinį kontaktą su taikinio 3'-gale esančia bazių pora (16 pav., dalis I).

5. Bse634I sąveikos su DNR tyrimai

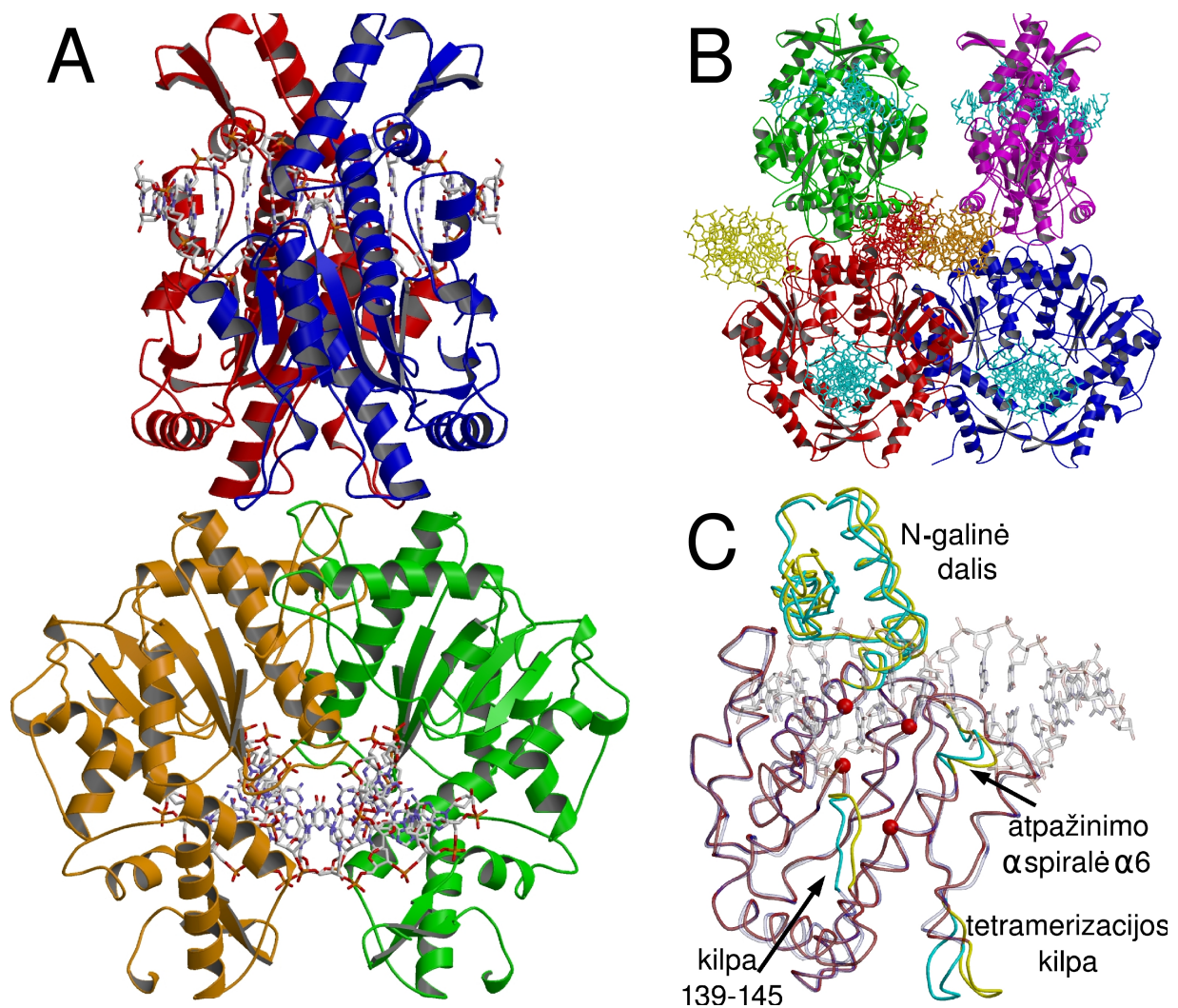
5.1. Bse634I-R226A kristalinimas su DNR, komplekso sandara

Siekiant išspręsti erdvinę Bse634I struktūrą komplekse su specifine DNR, laukinio tipo fermentas buvo kristalintas su įvairiais oligodupleksais. Deja, kristalų, tinkamų Rentgeno struktūrinei analizei, gauti nepavyko. Todėl buvo bandyta kristalinti su oligodupleksais turinčiais abu palindrominius atpažinimo taikinio variantus (GCCGGC arba ACCGGT) mutantinę Bse634I formą, kur Arg226 yra pakeistas į alaniną [69]. Su trim skirtingais oligodupleksais GC-1, AT-1 ir AT-2 (2 lentelė) buvo gauti (3 lentelė) dviejų kristalinių formų baltymo-DNR kristalai, kurie sklaidė Rentgeno spindulius iki 2.3-2.7 Å ribos (4 lentelė). Struktūros buvo išspręstos molekulinio pakeitimo metodu bei patikslintos, rezultatai yra apibendrinti 4 lentelėje.

Nepriklausomai nuo kristalo supakavimo du pirminiai Bse634I dimerai sąveikauja tarpusavyje, formuodami tetramerą (19AB pav.). Kiekvienas pirminis dimeras suriša po vieną DNR dupleksą, taigi tetrameras sąveikauja su dviem DNR molekulėmis. Nepaisant R226A mutacijos visų trijų Bse634I-DNR kompleksų struktūrose pirminių dimerų pozicija tetramere yra labai panaši į stebimą apo-Bse634I struktūroje.

DNR dupleksai komplekse su Bse634-R226A mutantu yra B-formos, DNR struktūros analizė su programa CURVES rodo, kad visuose trijuose kompleksuose DNR yra sulenkta į mažojo griovio pusę $14.5^\circ \pm 3.5^\circ$ kampu ties taikinio RCGGY centriniu dinukleotidu (pabraukta). Taip pat yra stebima duplekso deformacija ties išorine R1:Y6 bazių pora. Tarp pirimidino Y6 ir gretimos už taikinio esančios bazės yra suardyta stekingo sąveika (*angl.* stacking interaction). Tai įvyksta dėl Y6 pirimidino poslinkio link didžiojo DNR griovio, greičiausiai dėl kontakto su Asn37 iš mažojo griovio pusės.

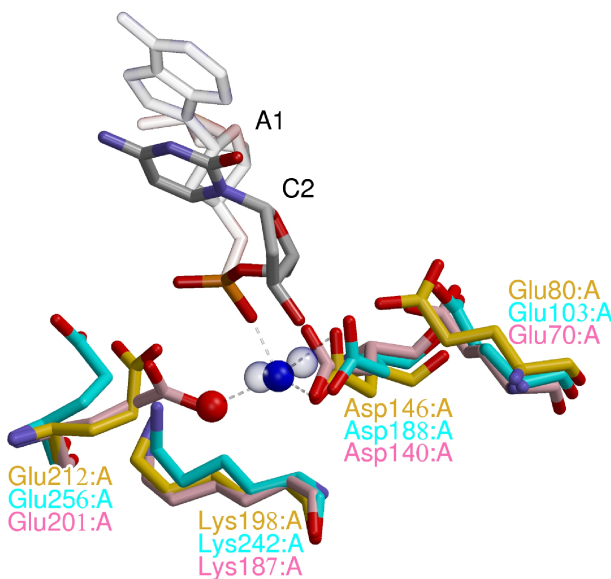
Lyginant su Bse634I apo-forma, komplekse su DNR baltymo konformacija pasikeičia labai nežymiai. Judri N-galinė dalis pajuda link DNR ir sudaro nespacificinius kontaktus su dupleksu (19C pav.). Taipogi, DNR surišimas indukuoja kitų baltymo fragmentų persitvarkymą, įskaitant α -spiralės α_6 , kuri dalyvauja CCGG atpažinime, judesį, bei kilpos 139-145. Taip pat skiriasi tetramerizacijos kilpos (a.r. 258-264), atsakingos už pirminių dimerų sąveiką, pozicija.



19 paveikslas. Bse634I-R226A komplekso su DNR erdvinė struktūra. (A) Bse634I-R226A tetrameras, surišęs oligodupleksus GC-1. Raudona, mėlyna, žalia ir oranžine spalvomis nuspalvinti baltymo monomerai. DNR molekulės nuspalvintos pagal CPK schemą. (B) Asimetrinis Bse634I-R226A kristalų vienetas su oligodupleksu AT-2. Raudona, mėlyna, žalia ir avietine spalvomis nuspalvinti pirminiai dimerai. Specifiškai surišti dupleksai yra žalsvai mėlyni, o nespecifiškai surišti dupleksai nuspalvinti geltona, raudona bei oranžine spalvomis. (C) Monomero (mėlynas, permatomas) iš Bse634I struktūros be DNR (PDB ID 1KNV, grandinė A) bei monomero iš komplekso Bse634I-GC-1 struktūros (raudonas) C α atomų karkasų sugretinimas. Baltymo grandinių fragmentai, kurių pozicijos žymiai skiriasi struktūroje be DNR, yra paryškinti žalsvai mėlynai, o struktūroje su DNR – geltonai. Aktyvaus centro aminorūgščių Glu80, Asp146, Lys198, Glu212 C α atomų pozicijos yra pavaizduotos kaip raudoni rutuliukai. DNR molekulė pavaizduota pilka spalva.

5.2. Bse634I aktyvus centras

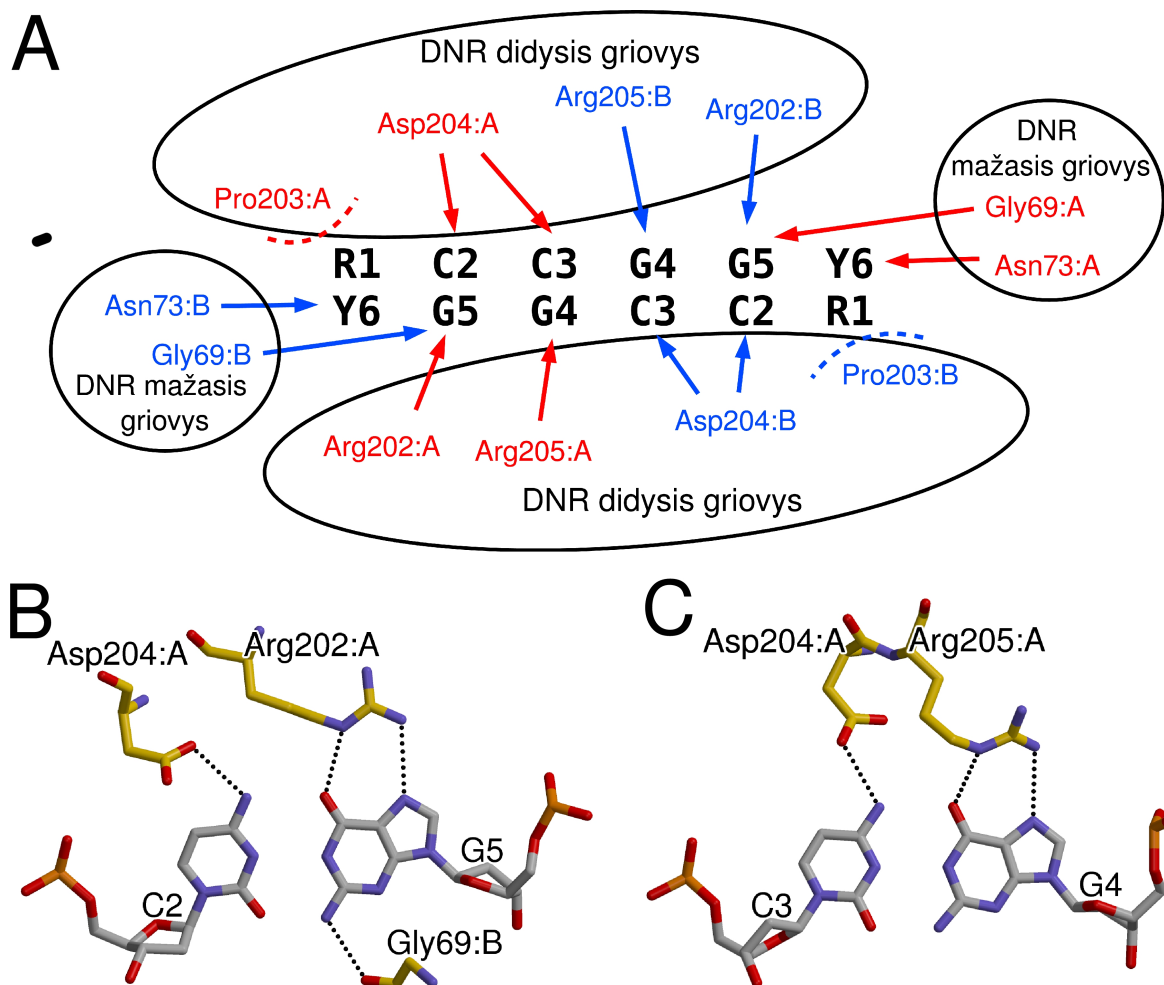
Bse634I aktyvus centras yra suformuotas iš Glu80, Asp146, Lys198 ir Glu212, kurios (išskyrus Glu80) atitinka konservuotą PDX₄₆₋₅₃KX₁₃E sekos motyvą, būdingą PD-(D/E)XK superšeimai. Tik Glu212 šoninės grandinės pozicija nėra griežtai užfiksuota struktūrose. Sugretinus Bse634I, NgoMIV bei SgrAI struktūras paaiškėjo, kad aktyviųjų centrų a.r. C α atomų pozicijos beveik sutampa (20 pav). Baltymo komplekso su AT-1 dupleksu struktūroje šalia skeliamos fosfodiesterinės jungties yra padidėjęs elektronų tankis, kuris gali būti priskirtas kalcio jonui. Keli kalcio jono koordinaciniai elementai gali būti identifikuoti. Vieną iš apikalinių pozicijų yra užėmęs C2 nukleotido fosfodiesterinės grupės deguonies atomas, kitą – Leu197 pagrindinės grandinės deguonies atomas. Dar du galimi elementai galėtų būti Asp146 šoninės grandinės deguonies atomai bei vandens molekulė.



20 paveikslas. Bse634I-R226A-AT-1 (geltona), NgoMIV (rozinė) ir SgrAI (žalsvai mėlyna) aktyviųjų centrų a.r. struktūrinis sugretinimas. Vandens molekulė pavaizduota raudonai, Ca²⁺ jonas Bse634I-R226A-AT-1 struktūroje pavaizduotas kaip tamsiai mėlynas rutuliukas, NgoMIV [PDB ID 4ABT] ir SgrAI [PDB ID 3DVO] struktūrose – kaip šviesiai mėlynas. Bse634I-R226A-AT-1 komplekso nukleotidai prie skeliamos fosfodiesterinės jungties nuspalvinti pilkai.

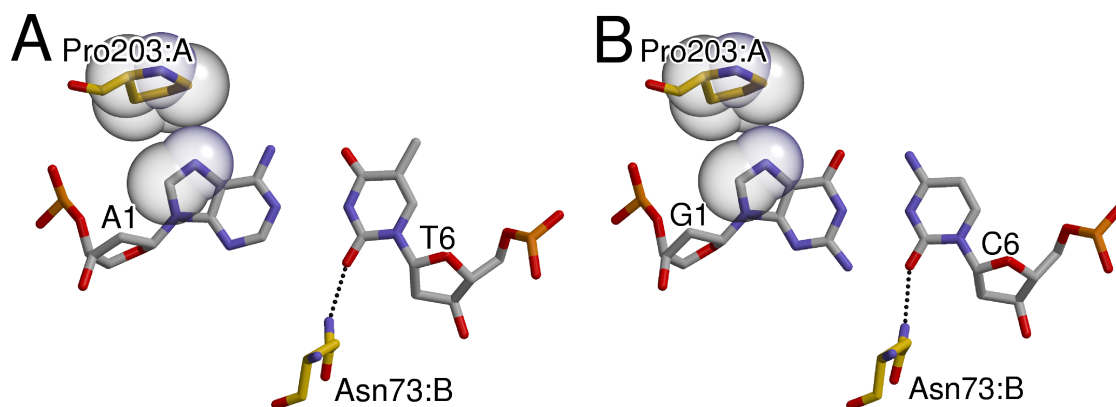
5.3. Bse634I taikinio atpažinimas

Kontaktai su CCGG: Kiekvieno pirminio Bse634I dimero atpažinimo α -spiralės $\alpha 6$ išsidėsto DNR didžiajame griovyje. Abiejų α -spiralių N-gale esančios a.r. Arg202, Asp204 ir Arg205 per šoninių grandinių atomus sudaro specifinius kontaktus su taikinio centrinėmis CCGG bazėmis. Vienas Bse634I monomeras sudaro kontaktus tik su puse CCGG sekos (21A pav.). Arg202 ir Arg205 sudaro vandenilines jungtis su G5 ir G4 bazėmis, atitinkamai, o Asp204 sudaro vandenilinės jungtis su C2 ir C3 bazėmis (21 pav., dalys B ir C). Iš mažojo DNR griovio pusės Gly69 pagrindinės grandinės deguonies atomas yra vandenilinės jungties atstumu (3.0 Å) nuo G5 bazės (21B pav.). Struktūrinis REazių-DNR kompleksų Bse634I, NgoMIV ir SgrAI sugretinimas (nepateiktas) parodo, kad CCGG atpažinimui visos trys REazės naudoja identišką RXDR aminorūgščių motyvą, kuris yra išsidėstęs atpažinimo spiralių N-galuose.



21 paveikslas. Bse634I specifinė sąveika su atpažinimo seka. (A) Schematinis specifinių sąveikų tarp Bse634I monomero ir atpažinimo taikinio atvaizdavimas. Bse634I A ir B monomerų a.r. liekanos pažymėtos raudonai ir mėlynai. Vandenilinės jungtys pažymėtos rodyklėmis, van der Valso sąveika su purino bazėmis – punktyrine linija. (B, C) Detalus sąveikos su bazių poromis C2:G5 (pav. dalis B) bei C3:G4 (pav. dalis C) atvaizdavimas.

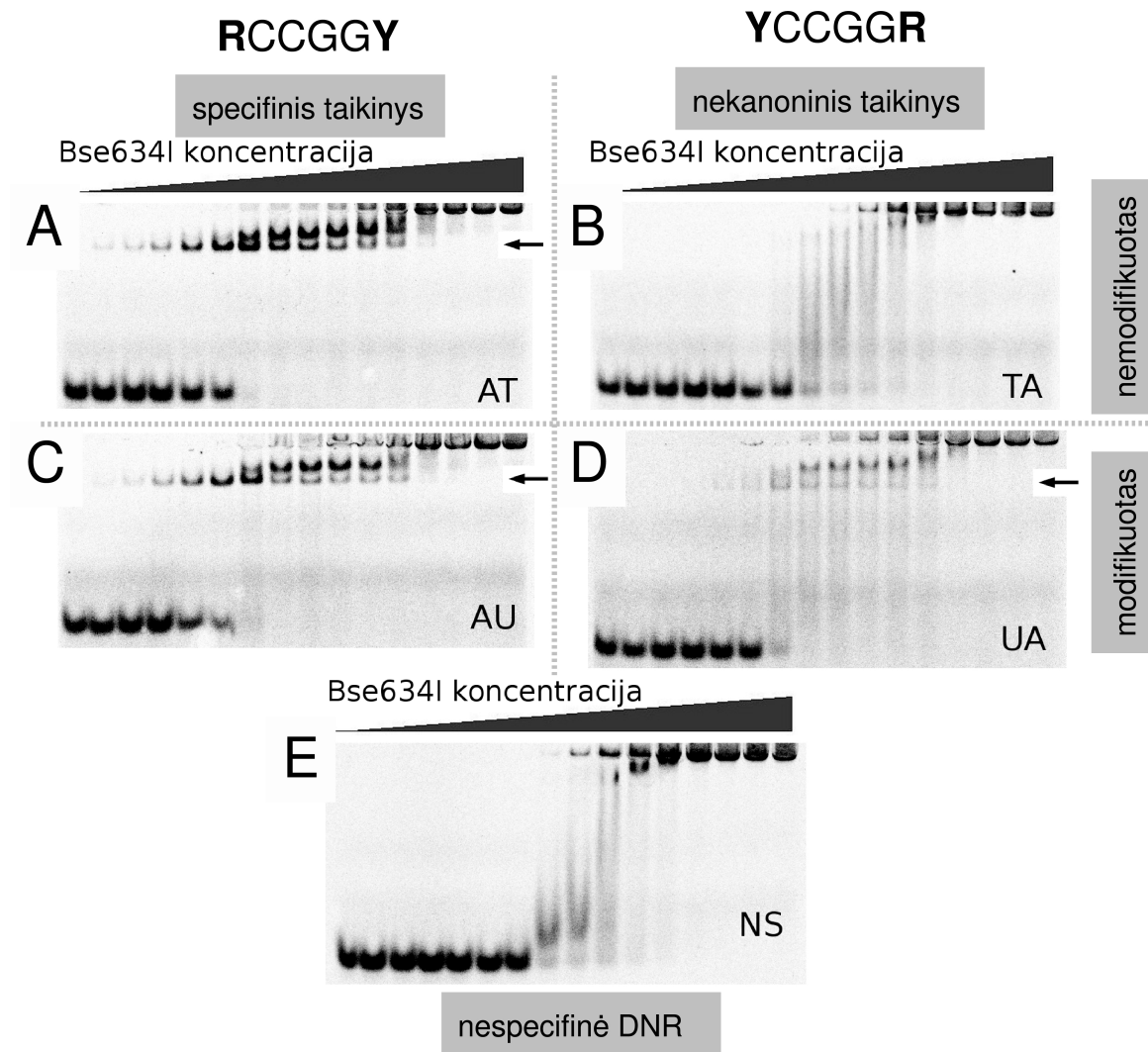
Kontaktai su išorinė R1:Y6 bazių pora: Bse634I turi konservatyvų centrinio CCGG motyvo atpažinimo mechanizmą, labai panašų į sutinkamą NgoMIV ir SgrAI REazėse, bet šio baltymo specifiškumas išorinei bazių porai skiriasi. NgoMIV griežtai atpažįsta G:C bazių porą, o Bse634I toleruoja G:C arba A:T bazių poras. Toks specifiškumas 6 bp taikiniui dalinai persidengia su SgrAI specifiškumu 8 bp sekai CRCCGGYG. Bse634I struktūros su oligodupleksais, turinčiais GCCGGC (oligodupleksas GC-1, 2 lentelė) arba ACCGGT (dupleksai AT-1 ir AT-2, 2 lentelė) taikinius, iliustruoja, kaip baltymas sąveikauja su dviem alternatyviais taikinio variantais. Abu pirminio dimero monomerai sudaro kontaktus su abiejų taikinių A1:T6 ir G1:C6 bazių poromis iš didžiojo ir mažojo griovio pusių (22 pav.). Didžiajame griovyje Pro203 šoninė grandinė yra van der Valso kontakto atstumu nuo A1 bei G1 bazių (22 pav.). Iš mažojo griovio pusės Asn73 šoninė grandinė sudaro vandenilinę jungtį su T6 ir C6 bazių O2 atomais.



22 paveikslas. Detalus Bse634I kontaktų atvaizdavimas su taikinio išorine bazių pora R1:Y6. (A) Kontaktai su bazių pora A1:T6 komplekse su AT-1 dupleksu. (B) Kontaktai su bazių pora G1:C6 komplekse su GC-1 dupleksu. Abiejose paveikslėlio dalyse purino R1 bazės C8 ir N7 atomų bei prolinio Pro203 šoninės grandinės atomų van der Valso paviršiai yra pavaizduoti kaip permatomos sferos, DNR nuspalvinta pagal CPK schemą.

5.4. Bse634I DNR surišimo ir karpymo eksperimentai

Siekdami patikrinti van der Valso kontakto svarbą išorinės bazių poros R1:Y6 atpažinimui, mes atlikome DNR surišimo ir karpymo eksperimentus, panaudodami dupleksus su specifiniu, kanoniniu (ACCGGT arba GCCGGC) bei nekanoniniu (TCCGGA arba CCCGGG) taikiniu, arba dupleksus su modifikuotais kanoniniais bei nekanoniniais taikiniai (2 lentelė). Taikiniuose modifikacijos buvo įvestos kelias būdais. Vienu atveju timino bazė buvo pakeista uridino baze, kuri 5-oje padėtyje neturi metilo grupės. Kitu atveju guaninas buvo pakeistas inozinu, kuris neturi amino grupės 2-oje padėtyje. Visų oligodupleksų taikinį supančios sekos buvo identiškos. DNR surišimo eksperimentai parodė, kad AT bei GC dupleksai su Bse634I taikiniu yra surišami esant mažoms baltymo koncentracijoms, o didinant baltymo koncentraciją yra stebimas nespecifinio komplekso, lėčiau migruojančio gelyje, atsiradimas (23A pav.). Toks Bse634I-DNR kompleksų judrumas atitinka stebimą anksčiau aprašytoje studijoje [70]. Eksperimentai parodė, kad dupleksai, turintys uridiną vietoj timino (AU) (23C pav.) bei inoziną vietoj guanino (IC), sukuria DNR surišimo vaizdą, panašų į stebimus dupleksų AT bei GC atveju. Taigi, pirimidino metilo grupė bei purino 2-oje pozicijoje esanti amino/okso grupė neturi įtakos DNR susirišimui su Bse634I. Tai atitinka Rentgeno struktūrinės analizės išvadas, nes minėtos bazių grupės neturi tiesioginių arba netiesioginių kontaktų su Bse634I. Iš kitos pusės, oligodupleksai TA (23B pav.) ir CG (duomenys nepateikti), turintys nekanoninius taikinius, yra surišami Bse634I su tokiu pat mažu afiniškumu, kaip ir nespecifinė DNR (23E pav.). Įdomu tai, kad modifikuoto duplekso UA (23D pav.) susirišimo vaizdas yra artimesnis stebimam kanoninio AT duplekso atveju, negu nekanoninio TA atveju. Pažymėtina, kad specifinio komplekso juostelė atsiranda gelyje, esant didesniems baltymo kiekiams, negu gelyje su AT dupleksu. Modifikuoto CI duplekso atveju yra sudaromi tik nespecifiniai kompleksai, analogiški nekanoniniam CG dupleksui (duomenys nepateikti).



23 paveikslas. DNR oligodupleksų, turinčių kanoninius taikinius, surišimo su Bse634I tyrimas. Panaudoto oligoduplekso pavadinime raidė „U“ reiškia, kad sekoje buvo uridinas, NS – kad panaudotas oligodupleksas be CCGG sekos. Bse634I koncentracija mėginiuose didėja tiesiškai nuo 0.1 nM iki 5 μM (monomero). Pirmas takelis yra vien DNR pavyzdys. Specifiniai arba specifinio tipo Bse634I-DNR kompleksai yra pažymėti rodyklėmis.

Kitame etape mes analizavome oligodupleksų su kanoniniais bei nekanoniniais taikiniai hidrolizę. Kinetiniai eksperimentai buvo atliekami esant optimaliai fermento koncentracijai, kuri leidžia pasiekti maksimalų karpymo greitį. Greičių konstantų reikšmės pateiktos 7 lentelėje. Kaip matyti iš pateiktų duomenų, Bse634I karmo DNR su modifikuotais kanoniniais taikiniai (AU bei IC) taip pat greitai kaip ir specifinius dupleksus ($4-13 \text{ min}^{-1}$ esant 25°C), o tai rodo, kad modifikacijos kanoniniuose taikiniuose neturi didelės įtakos hidrolizės greičiui. Bet dupleksai su nekanoniniais taikiniai (TA, CG, UA ir CI) yra hidrolizuojami žymiai lėčiau, ir, esant 25°C temperatūrai, jų karpymo greičiai negali būti patikimai išmatuoti. Kadangi Bse634I yra termofilinis fermentas, tai substratu TA, CG, UA ir CI karpymo greičiai buvo tirti esant 50°C . Esant tokioms sąlygoms, kanoninių substratų karpymo greičiai buvo pernelyg dideli ir jų nebuvo įmanoma analizuoti įprastais metodais. Iš kitos pusės, net

nekanoniniai TA ir CG dupleksai buvo hidrolizuojami vis dar labai lėtai. Įdomu tai, kad, vykdant eksperimentus tokiomis sąlygomis, nekanoninio UA duplekso hidrolizės greitis yra trimis dydžio eilėmis didesnis negu TA duplekso karpymo greitis. Tuo tarpu nekanoninis modifikuotas CI dupleksas yra karpomas taip pat lėtai, kaip ir nekanoniniai nemodifikuoti dupleksai CG and TA.

7 lentelė. Oligodupleksų hidrolizė wt Bse634I

Oligodupleksas	k, (min ⁻¹)	
	esant 25°C	esant 50°C
AT	10±1.3	-
GC	4.1±0.9	-
AU	5.4±1.3	-
IC	13±2.9	-
TA	<i>nekarpomas*</i>	5.7±0.7×10 ⁻⁵
CG	<i>nekarpomas</i>	8.2±0.8×10 ⁻⁵
UA	<i>nekarpomas</i>	6.9±0.8×10 ⁻²
CI	<i>nekarpomas</i>	3.8±0.9×10 ⁻⁵
NS	<i>nekarpomas</i>	<i>nekarpomas</i>

* – „nekarpomas“ reiškia, kad hidrolizės produktai nebuvo aptikti po 48 val. inkubacijos. Brūkšnelis reiškia, kad eksperimentas nebuvo atliekamas.

Taigi DNR karpymo bei surišimo tyrimai rodo, kad nepalanki sterinė sąveika tarp timino bazės metilo grupės ir prolino Pro203 yra svarbi atskiriant ACCGGT seką nuo TCCGGA sekos. Deja, taikinio pirmoje ir šeštoje pozicijoje purino, bet ne timino, atpažinimas negali būti pilnai paaiškintas tuo, kad yra prarandamas van der Valso kontaktas tarp purino ir Pro203. Kadangi duplekso su UCCGGA taikiniu karpymo greičiai yra žymiai mažesni negu specifinio duplekso TCCGGA, galima iškelti hipotezę, kad Bse634I netoleruoja GCCGGC taikinio dėl netiesioginio atpažinimo mechanizmo, kuris yra sąlygotas nepalankių DNR deformacijų.

IŠVADOS

1. Restrikcijos endonukleazės EcoRII C-galinio katalizinio domeno dimeras išsuka iš DNR spiralės centrinius nukleotidus pseudosimetrinėje 5'-CCWGG sekoje, paversdamas ją į simetrinę CCGG seką. Centrinų nukleotidų išsukimas leidžia EcoRII-C panaudoti konservatyvų mechanizmą CC:GG dinukleotidams atpažinti.
2. Restrikcijos endonukleazės EcoRII N-galinis alosterinis domenas suriša 5'-CCWGG seką kaip monomeras vienoje orientacijoje, kurią nulemia specifiniai kontaktai didžiajame DNR griovyje su centrine T:A bazių pora.
3. Struktūrinis DNR sekos atpažinimo mechanizmas, nustatytas EcoRII-N bei BfiI-C domenams, yra bendras B3 transkripcijos veiksnių superšeimai.
4. Restrikcijos endonukleazės Bse634I (R226A) mutantas pasitelkia konservatyvius struktūrinius elementus CCGG motyvo atpažinimui 5'-RCCGGY sekoje ir naudoja tiesioginio bei netiesioginio atpažinimo mechanizmus R:Y bazių porai atpažinti.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. **Golovenko D.**, Manakova E., Tamulaitienė G., Gražulis S. and Šikšnys V. (2009) Structural mechanisms for the 5'-CCWGG sequence recognition by the N- and C-terminal domains of EcoRII. *Nucleic Acids Res* 37:6613-6624
2. Manakova E., Gražulis S., Zaremba M., Tamulaitienė G., **Golovenko D.** and Šikšnys V. (2012) Structural mechanisms of the degenerate sequence recognition by Bse634I restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res* 40:6741-6751

Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **Golovenko D.**, Manakova E., Gražulis S. and Šikšnys V. (2008) Crystallographic studies of EcoRII-DNA complex: one enzyme – two DNA recognition mechanisms. The 10th International EMBL PhD Symposium, Heidelberg, Germany; October 23-25.
2. **Golovenko D.**, Manakova E., Gražulis S. and Šikšnys V. (2010) Structural mechanisms for the DNA recognition by restriction endonuclease EcoRII. The 6th New England BioLabs Meeting on DNA Restriction and Modification, Bremen, Germany; August 1-6.

Kitos publikacijos:

1. Čapkauskaitė E., Baranauskienė L., **Golovenko D.**, Manakova E., Gražulis S., Tumkevičius S. and Matulis D. (2010) Indapamide-like benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrases I, II, VII, and XIII. *Bioorg Med Chem* 18:7357-7364
2. Sūdžius J., Baranauskienė L., **Golovenko D.**, Matulienė J., Michailovienė V., Torresan J., Jachno J., Sukackaitė R., Manakova E., Gražulis S., Tumkevičius S. and Matulis D. (2010) 4-[N-(substituted 4-pyrimidinyl)amino]benzenesulfonamides as inhibitors of carbonic anhydrase isozymes I, II, VII, and XIII. *Bioorg Med Chem* 18:7413-7421
3. Baranauskienė L., Hilvo M., Matulienė J., **Golovenko D.**, Manakova E., Dudutienė V., Michailovienė V., Torresan J., Jachno J., Parkkila S., Maresca A., Supuran C.T., Gražulis S. and Matulis D. (2010) Inhibition and binding studies of carbonic anhydrase isozymes I, II and IX with benzimidazo[1,2-c][1,2,3]thiadiazole-7-sulphonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem* 25:863-870

FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo iš dalies finansuoti Makso Planko (Max Planck) draugijos (Vokietija), Lietuvos Mokslo Tarybos bei MoBiLi programos FP7-REGPOT-2009-1 lėšomis.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė	Dmitrij Golovenko
Gimimo data	1979 02 01
Darbo adresas	Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius Vilniaus Universitetas Biotechnologijos institutas V.A. Graičiūno 8 Vilnius LT-02241
Telefonai	+370 5 2602556 (darbo) +370 614 45079 (asmeninis)
Faksas	+370 5 2602116 (darbo)
E-paštas	dima@ibt.lt
Išsilavinimas	
1997-2001	Biochemijos bakalauras Vilniaus Universitetas (Vilnius, Lietuva)
2001-2003	Biochemijos magistras Vilniaus Universitetas (Vilnius, Lietuva)
2004-2008	Biochemijos doktorantūros studijos Vilniaus Universitetas, Biotechnologijos institutas (Vilnius, Lietuva)
Darbo patirtis	Vilniaus Universiteto Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius
2002-2003	Laborantas
2003-2004	Jaunesnysis mokslo darbuotojas
2005-	Bioinžinierius

PADEKA

Esu labai dėkingas darbo vadovui dr. Sauliui Gražuliui už paskatinimą pradėti baltymų kristalografijos doktorantūros studijas, už išmokymą dirbti su Rentgeno spindulių aparatūra bei atviro kodo programine įranga, taip pat už atvirą bendravimą ir neįkainojamus pasiūlymus bei pagalbą rengiant šią disertaciją ir disertacijos santrauką.

Taip pat dėkoju prof. Virginijui Šikšniui už puikius mokslinių tyrimų objektus, už mokslines diskusijas, pasiūlymus ir pagalbą rengiant šią disertaciją.

Dėkoju dr. Elenai Manakovai už EcoRII-C ir Bse634I-R226A kristalus su DNR, taip pat už DNR surišimo bei kinetikos eksperimentus su Bse634I. Taip pat dėkoju dr. Elenai Manakovai už kritines pastabas rengiant šią disertaciją.

Dėkoju dr. Giedrei Tamulaitienei ir dr. Matthias Bochtler (International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland) už pagalbą surenkant duomenis DORIS žiediniame dalelių greitintuve. Esu dėkingas dr. Giedriui Sasnauskui ir dr. Gintautui Tamulaičiui už konsultacijas atliekant kinetikos ir DNR surišimo tyrimus. Norėčiau padėkoti dr. Mindaugui Zarembai už konsultacijas atliekant dalinės proteolizės eksperimentus ir visiems kolegoms už diskusijas, komentarus ir pasiūlymus.

Esu dėkingas prof. Monikai Reuter (Institute of Virology at Humboldt University, Berlin, Germany) už plazmides EcoRII-N ir EcoRII-Y41A raiškai. Esu dėkingas dr. Arūnui Lagunavičiui ir dr. Violetai Morin (University of Konstanz, Baden-Württemberg, Germany) už plazmides BfiI-K107A raiškai.

Dėkoju dr. Matthew Groves, dr. Gleb Bourenkov ir dr. Manfred S. Weiss už pagalbą atliekant eksperimentus DORIS žiediniame dalelių greitintuve (Hamburg, Germany) EMBL spindulių linijose X11, X12 ir X13.

Norėčiau padėkoti dr. Garib Murshudov (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) ir dr. Haim Rozenberg (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) už pagalbą su kristalografine programine įranga.

Ypač esu dėkingas tėvams ir artimiesiems už jų rūpestį ir palaikymą.

SUMMARY

Due to their unique specificity, restriction endonucleases (REases) have gained widespread application as indispensable tools for *in vitro* manipulation and cloning of DNA. Delineation of the repertoire of the protein folds, providing three-dimensional portraits of the REases by crystallographic methods, should reveal how different folds are tailored to function as restriction enzymes. The major goal of this work was to explore the specificity-structure relationships within PD-(D/E)XK and phospholipase D superfamily enzymes using a combination of the crystallographic and biochemical methods. We have focused on the Bse634I and EcoRII restriction enzymes belonging to the Cfr10I/NgoMIV/Bse634I branch of the PD-(D/E)XK superfamily and the BfiI REase from the PLD superfamily.

The dissertation presents the crystal structure of the Bse634I REase mutant (R226A) complexed with two alternative target sites 5'-ACCGGT and 5'-GCCGGC. The analysis of the crystal structures revealed for the first time that the degenerate base pair recognition by Bse634I is achieved through the combination of direct and indirect readout mechanisms. The crystal structures of the N- and C-terminal domains of EcoRII solved in the DNA bound form revealed different structural mechanisms used for the recognition of the same target sequence 5'-CCWGG. The first structural evidence has been provided that the C-terminal domain of EcoRII (EcoRII-C) flips out the central nucleotides A/T while interacting with its target site, enabling the EcoRII-C to use symmetric conserved structural elements for the recognition of the CCGG core. Furthermore, the crystal structure of the EcoRII N-terminal domain (EcoRII-N) provided the first glimpse into the B3 family domain in the DNA bound form. Finally, the crystal structure of the C-terminal DNA binding domain of BfiI (BfiI-C) bound to the target site 5'-ACTGGG enabled the first structural comparison of two B3-family domains (EcoRII-N and BfiI-C) in the DNA-bound form.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62:685-707
2. Pingoud A JA (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 29:3705-3727
3. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D (2010) REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 38:D234-6
4. Orłowski J, Bujnicki JM (2008) Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses. *Nucleic Acids Res* 36:3552-3569
5. Berman H, Henrick K, Nakamura H (2003) Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat Struct Biol* 10:980
6. Venclovas C, Timinskas A, Siksnys V (1994) Five-stranded beta-sheet sandwiched with two alpha-helices: a structural link between restriction endonucleases EcoRI and EcoRV. *Proteins* 20:279-282
7. Orłowski J BJ (2008) Structural and evolutionary classification of Type II restriction enzymes based on theoretical and experimental analyses. *Nucleic Acids Res* 36:3552-3569
8. Tamulaitis G, Solonin AS, Siksnys V (2002) Alternative arrangements of catalytic residues at the active sites of restriction enzymes. *FEBS Lett* 518:17-22
9. Repin VE, Lebedev LR, Puchkova L, Serov GD, Tereschenko T et al. (1995) New restriction endonucleases from thermophilic soil bacteria. *Gene* 157:321-322
10. Zaremba M, Owsicka A, Tamulaitis G, Sasnauskas G, Shlyakhtenko LS et al. (2010) DNA synapsis through transient tetramerization triggers cleavage by Ecl18kI restriction enzyme. *Nucleic Acids Res* 38:7142-7154
11. Mizuno H, Suzuki T, Akagawa M, Yamasato K, Yamada Y (1990) Purification, properties and determinations of recognition sequence and cleavage site of restriction endonuclease from "Agrobacterium gelatinovorum" IAM 12617, a marine bacterium (AgeI). *Agric Biol Chem* 54:1797-1802
12. Lubys A, Jurenaite S, Janulaitis A (1999) Structural organization and regulation of the plasmid-borne type II restriction-modification system Kpn2I from *Klebsiella pneumoniae* RFL2. *Nucleic Acids Res* 27:4228-4234
13. Deibert M, Grazulis S, Sasnauskas G, Siksnys V, Huber R (2000) Structure of the tetrameric restriction endonuclease NgoMIV in complex with cleaved DNA. *Nat Struct Biol* 7:792-799
14. Bozic D, Grazulis S, Siksnys V, Huber R (1996) Crystal structure of *Citrobacter freundii* restriction endonuclease Cfr10I at 2.15 Å resolution. *J Mol Biol* 255:176-186
15. Grazulis S, Deibert M, Rimseliene R, Skirgaila R, Sasnauskas G et al. (2002) Crystal structure of the Bse634I restriction endonuclease: comparison of two enzymes recognizing the same DNA sequence. *Nucleic Acids Res* 30:876-885
16. Park CK, Joshi HK, Agrawal A, Ghare MI, Little EJ, Dunten PW, Bitinaite J and Horton NC (2010) Domain swapping in allosteric modulation of DNA specificity. *PLoS Biol* 8:e1000554
17. Szczepanowski RH, Carpenter MA, Czapsinska H, Zaremba M, Tamulaitis G et al. (2008) Central base pair flipping and discrimination by PspGI. *Nucleic Acids Res* 36:6109-6117
18. Zhou XE, Wang Y, Reuter M, Mucke M, Kruger DH et al. (2004) Crystal structure of type

IIe restriction endonuclease EcoRII reveals an autoinhibition mechanism by a novel effector-binding fold. *J Mol Biol* 335:307-319

19. Tamulaitis G, Sasnauskas G, Mucke M, Siksnys V (2006) Simultaneous binding of three recognition sites is necessary for a concerted plasmid DNA cleavage by EcoRII restriction endonuclease. *J Mol Biol* 358:406-419
20. Bochtler M, Szczepanowski RH, Tamulaitis G, Grazulis S, Czapinska H et al. (2006) Nucleotide flips determine the specificity of the Ecl18kI restriction endonuclease. *EMBO J* 25:2219-2229
21. Gaigalas M, Maneliene Z, Kazlauskienė R, Petrusyte M, Janulaitis A (2002) PfoI, a unique type II restriction endonuclease that recognises the sequence 5'-T downward arrow CCNGGA-3'. *Nucleic Acids Res* 30:e98
22. Pein CD, Reuter M, Meisel A, Cech D, Kruger DH (1991) Activation of restriction endonuclease EcoRII does not depend on the cleavage of stimulator DNA. *Nucleic Acids Res* 19:5139-5142
23. Vitkute J, Maneliene Z, Petrusyte M, Janulaitis A (1998) BfiI, a restriction endonuclease from *Bacillus firmus* S8120, which recognizes the novel non-palindromic sequence 5'-ACTGGG(N)5/4-3'. *Nucleic Acids Res* 26:3348-3349
24. Sapranuskas R, Sasnauskas G, Lagunavicius A, Vilkaitis G, Lubys A et al. (2000) Novel subtype of type IIs restriction enzymes. BfiI endonuclease exhibits similarities to the EDTA-resistant nuclease Nuc of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 275:30878-30885
25. Grazulis S, Manakova E, Roessle M, Bochtler M, Tamulaitiene G et al. (2005) Structure of the metal-independent restriction enzyme BfiI reveals fusion of a specific DNA-binding domain with a nonspecific nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15797-15802
26. Lagunavicius A, Sasnauskas G, Halford SE, Siksnys V (2003) The metal-independent type IIs restriction enzyme BfiI is a dimer that binds two DNA sites but has only one catalytic centre. *J Mol Biol* 326:1051-1064
27. Stuckey JA DJ (1999) Crystal structure of a phospholipase D family member. *Nat Struct Biol* 6:278-284
28. Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T et al. (2004) Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell* 16:3448-3459
29. Zaremba M, Urbanke C, Halford SE, Siksnys V (2004) Generation of the BfiI restriction endonuclease from the fusion of a DNA recognition domain to a non-specific nuclease from the phospholipase D superfamily. *J Mol Biol* 336:81-92
30. Silanskas A, Zaremba M, Sasnauskas G, Siksnys V (2012) Catalytic activity control of restriction endonuclease--triplex forming oligonucleotide conjugates. *Bioconjug Chem* 23:203-211
31. Reuter M., Kupper D., Meisel A., Schroeder C. and Kruger D.H. (1998) Cooperative binding properties of restriction endonuclease EcoRII with DNA recognition sites. *J Biol Chem* 273:8294-8300
32. Shlyakhtenko L.S., Gilmore J., Portillo A., Tamulaitis G., Siksnys V. and Lyubchenko Y.L. (2007) Direct visualization of the EcoRII-DNA triple synaptic complex by atomic force microscopy. *Biochemistry* 46:11128-11136
33. Lagunavicius A., Sasnauskas G., Halford S.E. and Siksnys V. (2003) The metal-independent type IIs restriction enzyme BfiI is a dimer that binds two DNA sites but has only one catalytic centre. *J Mol Biol* 326:1051-1064
34. Zaremba M., Urbanke C., Halford S.E. and Siksnys V. (2004) Generation of the BfiI

- restriction endonuclease from the fusion of a DNA recognition domain to a non-specific nuclease from the phospholipase D superfamily. *J Mol Biol* 336:81-92
35. Zaremba M., Sasnauskas G., Urbanke C. and Siksnys V. (2006) Allosteric communication network in the tetrameric restriction endonuclease Bse634I. *J Mol Biol* 363:800-812
 36. Leslie A.G. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62:48-57
 37. Evans P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62:72-82
 38. French G. and Wilson K. (1978) On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallogr* A34:517-525
 39. Vagin A. and Teplyakov A. (2000) An approach to multi-copy search in molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56:1622-1624
 40. Navaza J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:1367-1372
 41. Read R.J. (1986) Improved Fourier coefficients for maps using phases from partial structures with errors. *Acta Crystallogr* A42:140-149
 42. Emsley P. and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:2126-2132
 43. Bhat T.N. (1988) Calculation of an OMIT map. *Journal of Applied Crystallography* 21:279-281
 44. Brunger A.T., Adams P.D., Clore G.M., DeLano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T. and Warren G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54:905-921
 45. Winn M.D., Murshudov G.N. and Papiz M.Z. (2003) Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions. *Methods Enzymol* 374:300-321
 46. Adams P.D., Afonine P.V., Bunkóczi G., Chen V.B., Davis I.W., Echols N., Headd J.J., Hung L., Kapral G.J., Grosse-Kunstleve R.W., McCoy A.J., Moriarty N.W., Oeffner R., Read R.J., Richardson D.C., Richardson J.S., Terwilliger T.C. and Zwart P.H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:213-221
 47. Laskowski R.A., Moss D.S. and Thornton J.M. (1993) Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J Mol Biol* 231:1049-1067
 48. Vriend G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8:52-6, 29
 49. Chen V.B., Arendall W.B.3., Headd J.J., Keedy D.A., Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S. and Richardson D.C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:12-21
 50. Tamulaitis G., Zaremba M., Szczepanowski R.H., Bochtler M. and Siksnys V. (2008) How PspGI, catalytic domain of EcoRII and Ecl18kI acquire specificities for different DNA targets. *Nucleic Acids Res* 36:6101-6108
 51. Williams T., Kelley C. (2007). Gnuplot 4.2: an interactive plotting program. (, ed.), vol. , ed. pp. ,
 52. Yoshioka K. (2002) KyPlot—a user-oriented tool for statistical data analysis and visualization. *CompStat.* 17:425–437
 53. Zhou X.E., Wang Y., Reuter M., Mucke M., Kruger D.H., Meehan E.J. and Chen L. (2004) Crystal structure of type IIE restriction endonuclease EcoRII reveals an autoinhibition

mechanism by a novel effector-binding fold. *J Mol Biol* 335:307-319

54. Szczepanowski R.H., Carpenter M.A., Czapinska H., Zaremba M., Tamulaitis G., Siksnys V., Bhagwat A.S. and Bochtler M. (2008) Central base pair flipping and discrimination by PspGI. *Nucleic Acids Res* 36:6109-6117
55. Bochtler M., Szczepanowski R.H., Tamulaitis G., Grazulis S., Czapinska H., Manakova E. and Siksnys V. (2006) Nucleotide flips determine the specificity of the Ecl18kI restriction endonuclease. *EMBO J* 25:2219-2229
56. Tamulaitis G., Zaremba M., Szczepanowski R., Bochtler M. and Siksnys V. (2007) Nucleotide flipping by restriction enzymes analyzed by 2-aminopurine steady-state fluorescence. *Nucleic Acids Res* 35:4792-4799
57. Pingoud V., Conzelmann C., Kinzbach S., Sudina A., Metelev V., Kubareva E., Bujnicki J.M., Lurz R., Luder G., Xu S. and Pingoud A. (2003) PspGI, a type II restriction endonuclease from the extreme thermophile *Pyrococcus* sp.: structural and functional studies to investigate an evolutionary relationship with several mesophilic restriction enzymes. *J Mol Biol* 329:913-929
58. Tamulaitis G., Solonin A.S. and Siksnys V. (2002) Alternative arrangements of catalytic residues at the active sites of restriction enzymes. *FEBS Lett* 518:17-22
59. Tamulaitis G., Mucke M. and Siksnys V. (2006) Biochemical and mutational analysis of EcoRII functional domains reveals evolutionary links between restriction enzymes. *FEBS Lett* 580:1665-1671
60. Kruger D.H. and Reuter M. (2005) Reliable detection of DNA cytosine methylation at CpNpG sites using the engineered restriction enzyme EcoRII-C. *Biotechniques* 38:855-856
61. Petrauskene O.V., Gromova E.S., Romanova E.A., Volkov E.M., Oretskaya T.S. and Shabarova Z.A. (1995) DNA duplexes containing methylated bases or non-nucleotide inserts in the recognition site are cleaved by restriction endonuclease R.EcoRII in presence of canonical substrate. *Gene* 157:173-176
62. Jen-Jacobson L., Engler L.E., Lesser D.R., Kurpiewski M.R., Yee C. and McVerry B. (1996) Structural adaptations in the interaction of EcoRI endonuclease with methylated GAATTC sites. *EMBO J* 15:2870-2882
63. Mucke M., Pingoud V., Grelle G., Kraft R., Kruger D.H. and Reuter M. (2002) Asymmetric photocross-linking pattern of restriction endonuclease EcoRII to the DNA recognition sequence. *J Biol Chem* 277:14288-14293
64. Yamasaki K., Kigawa T., Inoue M., Tateno M., Yamasaki T., Yabuki T., Aoki M., Seki E., Matsuda T., Tomo Y., Hayami N., Terada T., Shirouzu M., Osanai T., Tanaka A., Seki M., Shinozaki K. and Yokoyama S. (2004) Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. *Plant Cell* 16:3448-3459
65. Waltner J.K., Peterson F.C., Lytle B.L. and Volkman B.F. (2005) Structure of the B3 domain from Arabidopsis thaliana protein At1g16640. *Protein Sci* 14:2478-2483
66. Holm L., Kaariainen S., Rosenstrom P. and Schenkel A. (2008) Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24:2780-2781
67. Wang Y., Deng D., Zhang R., Wang S., Bian Y. and Yin Z. (2012) Systematic analysis of plant-specific B3 domain-containing proteins based on the genome resources of 11 sequenced species. *Mol Biol Rep* :
68. Tamulaitis G., Sasnauskas G., Mucke M. and Siksnys V. (2006) Simultaneous binding of three recognition sites is necessary for a concerted plasmid DNA cleavage by EcoRII restriction endonuclease. *J Mol Biol* 358:406-419
69. Zaremba M., Sasnauskas G., Urbanke C, Siksnys V (2006) Allosteric communication network in the tetrameric restriction endonuclease Bse634I. *J Mol Biol* 363:800-812

70. Zaremba M, Sasnauskas G, Urbanke C, Siksnyš V (2005) Conversion of the tetrameric restriction endonuclease Bse634I into a dimer: oligomeric structure-stability-function correlations. *J Mol Biol* 348:459-478