

**VILNIAUS UNIVERSITETAS  
BIOTECHNOLOGIJOS INSTITUTAS**

**Rasa Sukackaitė**

**RESTRIKCIJOS ENDONUKLEAZĖS BpuJI  
STRUKTŪRINIAI IR FUNKCINIAI TYRIMAI**

**Daktaro disertacijos santrauka**

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

**Vilnius, 2009**

Disertacija parengta Biotechnologijos institute 2004-2009 metais.

Mokslinis vadovas:

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

Mokslinis konsultantas:

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

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje.

Tarybos pirmininkas:

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

Nariai:

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

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Kauno Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija-04 P, baltymai, enzimologija-P310)

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

dr. Rolandas Meškys (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija-04 P, baltymai, enzimologija-P310)

Oponentai:

dr. Arvydas Lubys (UAB „Fermentas“, fiziniai mokslai, biochemija-04 P, baltymai, enzimologija-P310)

dr. Daumantas Matulis (Biotechnologijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija-04 P, baltymai, enzimologija-P310)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2009 m. gruodžio mėn. 4 d. 10 val. Biotechnologijos instituto aktų salėje, adresu Graičiūno 8, Vilnius, LT-02241, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2009 m. spalio mėn. d.

Disertaciją galima peržiūrėti Biotechnologijos instituto ir Vilniaus universiteto bibliotekose.

**VILNIUS UNIVERSITY  
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY**

**Rasa Sukackaitė**

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL STUDIES OF THE  
RESTRICTION ENDONUCLEASE BpuJI**

**Summary of doctoral dissertation**

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

**Vilnius, 2009**

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology from 2004 to 2009.

Scientific supervisor:

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

Scientific consultant:

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

The evaluation board of the doctoral thesis:

Chairman:

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

Members:

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

prof. habil. dr. Vida Mildažienė (Kaunas Vytautas Magnus university, physical sciences, biochemistry-04 P, proteins, enzymology-P310)

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

dr. Rolandas Meškys (Institute of Biochemistry, physical sciences, biochemistry-04 P, proteins, enzymology-P310)

Opponents:

dr. Arvydas Lubys (Fermentas UAB, physical sciences, biochemistry-04 P, proteins, enzymology-P310)

dr. Daumantas Matulis (Institute of Biotechnology, physical sciences, biochemistry-04 P, proteins, enzymology-P310)

The thesis defence will take place on 4<sup>th</sup> of December, 2009, 10 a.m. at the Institute of Biotechnology, Graičiūno 8, Vilnius, LT-02241, Lithuania.

The summary of the thesis was distributed on 1<sup>th</sup> of October, 2009.

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

# Turinys

Turinys.....	5
Sutrumpinimų sąrašas.....	6
Įvadas.....	7
1 Tyrimų metodika.....	9
2 Rezultatai ir jų aptarimas.....	13
2.1 BpuJI funkcinis charakterizavimas.....	13
2.1.1 Preliminarūs eksperimentai.....	13
2.1.2 Variabili BpuJI kirpimo vieta.....	13
2.1.3 BpuJI optimaliam aktyvumui reikalingi du taikiniai.....	14
2.1.4 Nuo 3'-galo priklausomas nukleazinis aktyvumas .....	14
2.1.5 BpuJI vienu metu gali surišti du taikinius.....	16
2.2 BpuJI struktūrinė organizacija.....	18
2.2.1 BpuJI tirpale yra dimeras.....	18
2.2.2 BpuJI monomeras turi atskirus domenų atpažinimui ir katalizei.....	18
2.2.3 Nuo 3'-galo priklausomas C-domeno nukleazinis aktyvumas.....	19
2.2.4 BpuJI C-domenas turi PD-(D/E)XK struktūrinę sanklodą .....	20
2.2.5 BpuJI N-domenas su taikiniu sąveikauja kaip monomeras .....	21
2.2.6 BpuJI ir jo domenų kristalinimas.....	21
2.2.7 BpuJI N-domeno/DNR komplekso erdvinė struktūra.....	21
2.2.8 BpuJI taikinio atpažinimas.....	23
2.3 BpuJI veikimo modelis ir panašumas į kitus baltymus.....	24
2.3.1 BpuJI veikimo modelis .....	24
2.3.2 BpuJI vieta restrikcijos endonukleazių klasifikacijoje.....	25
2.3.3 BpuJI C-domeno panašumas į kitus baltymus.....	26
2.3.4 BpuJI N-domeno panašumas į kitus baltymus.....	27
2.3.5 BpuJI, BspD6I ir FokI palyginimas.....	27
2.3.6 Nt.BspD6I/DNR komplekso modelis.....	30
Išvados.....	31
Padėka.....	32
Publikacijų sąrašas.....	33
Duomenys apie autorių.....	34
Summary.....	35
Literatūros sąrašas.....	36

## Sutrumpinimų sąrašas

DTT	1,4-ditiotreitolis
EDTA	etilendiaminotetraacto rūgštis
SLS	spiralė-linkis-spiralė
JSA	jaučio serumo albuminas
MES	2-(N-morfolino)-etansulfoninė rūgštis
PGR	polimerazės grandininė reakcija
PEG	polietilenglikolis
REazė	restrikcijos endonukleazė
R-M	restrikcija-modifikacija
NDS	natrio dodecilsulfatas
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis

## Ivadas

II tipo restrikcijos endonukleazės (REazės) atpažįsta 4-8 bp ilgio DNR sekas ir kerpa fosfodiesterinį ryšį šiose sekose arba šalia jų, palikdamos 5'-lipnius, 3'-lipnius, arba bukus galus. Šie fermentai atpažįsta ir hidrolizuoja DNR labai tiksliai, todėl jie yra plačiai naudojami biotechnologijoje, kaip molekuliniai įrankiai. REazių praktinė svarba stimuliuoja intensyvią naujų fermentų paiešką. REBASE<sup>1</sup> duomenų bazėje šiuo metu yra daugiau nei 3600 biochemiškai ar genetiškai apibūdintų II tipo REazių.

Baltymo struktūros požiūriu II tipo REazių grupė yra labai įvairi. Šie fermentai priklauso penkiems skirtingiems baltymų struktūrinės sanklodos tipams, taip pat skiriasi jų aktyvūs centrai, oligomerinė būsena, DNR sekos atpažinimo ir katalizės mechanizmai. Dauguma REazių priklauso vadinamajai PD-(D/E)XK struktūrinei sanklodai, kuri būdinga ir kai kurioms rekombinacijos bei DNR reparacijos nukleazėms.

Daugelio PD-(D/E)XK sanklodos REazių funkciškai aktyvi forma yra dimeras<sup>2, 3</sup>. Dimerą sudarantys monomerai turi po vieną aktyvų centrą, kuriame perkerpama viena DNR grandinė. Simetrinę DNR seką atpažįstančių REazių monomerai dažniausiai yra monodomeniniai baltymai, ir paprastai sąveikauja su puse simetrinio taikinio. REazių monomerai sudaro skirtingus dimerus. Dimerizacijos būdas lemia aktyvių centrų padėtį erdvėje ir tokiu būdu apsprendžia DNR kirpimo produktų struktūrą (5'-lipnūs, 3'-lipnūs arba buki galai)<sup>2-4</sup>.

PD-(D/E)XK sanklodos REazės gali turėti ir kitokią struktūrinę organizaciją. IIS tipo restrikcijos endonukleazė FokI turi atskirą DNR atpažinimo domeną, kuris yra sulietas su PD-(D/E)XK sanklodos nukleaziniu domenu<sup>5, 6</sup>. Dėl tokios struktūrinės organizacijos IIS tipo fermentai gali kirpti DNR toli nuo atpažinimo sekos. FokI atpažįsta asimetrinę seką 5'-GGATG ir kerpa viršutinę ir apatinę grandines atitinkamai už 9 ir 13 nt nuo taikinio (5'-GGATG (9/13)). Atskirus DNR atpažinimo ir katalizės domenus turi ir BfiI (5'-ACTGGG (4/5)), tačiau jos katalitinis domenas priklauso ne PD-(D/E)XK, o fosfolipazių D šeimai<sup>7, 8</sup>.

Beveik visi II tipo fermentai kerpa DNR griežtai apibrėžtoje vietoje taikinio atžvilgiu, tačiau kai kurių IIS tipo REazių kirpimo vieta nėra visiškai pastovi<sup>1</sup>. Pavyzdžiui, BfiI viršutinę grandinę kerpa už 4 nt taikinio, o apatinę – už 5 nt, tačiau viršutinę grandinę gali kirpti ir už 6 ir 7 nt nuo atpažinimo sekos<sup>9</sup>. Kirpimo vietos variabilumas būdingas ir kai kuriems IIB tipo fermentams, pavyzdžiui, AtoI (5'-(7/12-13) GAACN<sub>6</sub>TCC (12-13/7))<sup>10</sup>.

Restrikcijos endonukleazė BpuJI iš *Bacillus pumilus* RFL1458 kamieno atpažįsta 5'-CCCGT seką (K. Stankevičius, nepublikuota). Preliminarūs duomenys rodė, kad, skirtingai nei kitų žinomų IIS tipo fermentų, BpuJI kirpimo vieta gali būti variabili (Z. Maneliene, nepublikuota).

Šiame darbe buvo siekiama išaiškinti molekulinis ir struktūrinius mechanizmus, kurie lemia neįprastą BpuJI DNR karpymo pobūdį.

### **Šio darbo tikslai buvo:**

1. Detaliai ištirti, kaip BpuJI karmo įvairius substratus.
2. Nustatyti jos oligomerinę būseną ir spėjimą domeninę organizaciją.
3. Atlikti BpuJI ar jos atskirų domenų kristalografinius tyrimus.

**Mokslinis naujumas.** BpuJI yra pirma II tipo restrikcijos endonukleazė, kurios kirpimo vieta yra labai variabili. Darbo metu parodyta, kad neįprastą DNR karpymo pobūdį lemia jos domeninė sandara ir unikalios jos katalitinio domeno savybės. Pastarasis gali kirpti DNR tiek šalia taikinio, tiek netoli 3'-galo. Bioinformatinė analizė parodė, kad BpuJI katalitinis domenas yra panašus į Holidėjaus jungtis kerpančias nukleazes ir yra sutinkamas ir kituose baltymuose. Nustatyta BpuJI DNR atpažinimo domeno komplekso su DNR erdvinė struktūra, kuri parodė, kad šis domenas sekos atpažinimui naudoja spiralė-linkis-spiralė motyvus.

**Darbo reikšmė.** Variabili kirpimo vieta gali sukelti problemų norint gauti fiksuoto ilgio DNR fragmentus klonavimui arba kitiems eksperimentams. BpuJI struktūros-funkcijos ryšio tyrimai padeda geriau suprasti mechanizmus, kurie lemia variabilią IIS tipo fermentų kirpimo vietą ir numatyti kelius šiai problemai spręsti. Bioinformatiniais metodais ieškant į BpuJI katalitinį domeną panašių baltymų, buvo atrasta nauja spėjamų metilintą DNR kerpančių nukleazių šeima. Tokios nukleazės galėtų būti naudingos tiriant epigenetinius reiškinius. BpuJI atpažinimo domeno komplekso su DNR erdvinė struktūra atskleidė asimetrinio taikinio atpažinimo mechanizmą, kuris galėtų būti būdingas ir kitoms restrikcijos endonukleazėms.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. BpuJI tirpale yra dimeras, sudarytas iš dviejų monomerų, kurie turi atskirus domenus taikinio atpažinimui ir katalizei.
2. BpuJI katalitiniam domenui yra būdingas nuo 3'-galo priklausomas nukleazinis aktyvumas, kuris lemia sudėtingą DNR karpymo pobūdį.
3. BpuJI katalitinis domenas priklauso PD-(D/E)XK struktūrinei sanklodai, o BpuJI atpažinimo domeną sudaro du SLS subdomenai.
4. BpuJI taikinį atpažįstančios aminorūgštys yra išsidėsčiusios dviejų SLS motyvų atpažinimo spiralėse ir N-galinėje rankoje.
5. BpuJI atpažinimo domenas yra struktūriškai panašus į endonukleazę Nt.BspD6I, kerpančią tik vieną DNR grandinę.



# 1 Tyrimų metodika

**Oligonukleotidai ir DNR žymėjimas.** Oligonukleotidai buvo susintetinti „Metabion“. Juos lėtai sulydant buvo paruošti oligodupleksai (1 lentelė). Kur nurodyta, oligonukleotidai buvo pažymėti radioaktyvia žyme panaudojant T4 polinukleotidkinazę arba terminalinę polinukleotidiltransferazę („Fermentas“). Žymėtos DNR vizualizavimui naudoti „FujiFilm“ ekranai ir Cyclone™ skeneris su OptiQuant programa („PerkinElmer“).

**1 lentelė. Oligodupleksai**

Žymėjimas	Seka
12/12(SP)	5' GGTACCCGTGGA* 3' CCATGGGCACCT
16/16(SP)	5' TCGGTAACCCGTGGATC 3' AGCCATGGGCACCTAG
26/26(SP)	5' GAGCTCGGTACCCGTGGATCCTCTAG 3' TCGAGCCATGGGCACCTAGGAGATCT
16/16	5' AGCGTAGCACTGGGCT 3' TCGCATCGTGACCCGA
37/37	5' GTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGT 3' ACTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCTTAGGAGATCTCAT
37/25	5' GTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGT 3' ACTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCT
25/37	5' GTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG 3' ACTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCTTAGGAGATCTCAT
25/25	5' GTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGG 3' ACTTAAGCTCGAGCCATGGGCCCT

\*BpuJI atpažinimo seka paryškinta; SP – specifinis.

**Chromatografija.** SuperSW 2000 gel-filtracijos kolonėlė (“Tosoh Bioscience”) ir kitos kolonėlės bei sorbentai (“GE Healthcare”) naudoti pagal gamintojų rekomendacijas.

**BpuJI gryninimas.** BpuJI buvo gauta *E.coli* ER2267 kamiene su pACYC-MBpuJI ir pAL-BpuJI plazmidėmis (gautos iš dr. K.Stankevičiaus, Biotechnologijos institutas). Baltymas iš grubaus ekstrakto išgrynintas trimis chromatografijos stadijomis, paeiliui panaudojant heparin-sefarozę, mėlynosios sefarozę ir AH-sefarozę kolonėles. Preparatas saugotas saugojimo buferyje [10 mM Tris-HCl (pH 7,5; 25°C), 0,2 M KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,025% Triton X-100, 50% glicerolio], -20°C.

**Dalinė proteolizė.** Optimalios BpuJI proteolizės chimotripsinu ir termolizinu („SIGMA“) sąlygos buvo parinktos analizuojant pavyzdžius NDS-elektroforezės poliakrilamido gelyje metodu pagal Laemmli protokolą<sup>11</sup>. N-galinės aminorūgštys nustatytos Bristolio universitete.

**a) N- ir C-domenų gryninimas.** BpuJI (0,4 mg/ml) buvo karpytas chimotripsinu proteolizės buferyje A [10 mM kalio fosfato (pH 7,4), 100 mM KCl] 1 h 25°C

temperatūroje. N-domenas, gautas esant proteazės:BpuJI masės santykiui 1:800, buvo išgrynintas panaudojant Superdex 75 HR kolonėlę, o C-domenas, gautas esant proteazės:BpuJI masės santykiui 1:16, – heparin sefarozės.

**b) N-domeno/DNR komplekso gryninimas.** BpuJI sumaišytas su specifiniu oligodupleksu 16/16(SP) arba 12/12(SP) (1 lentelė) ir termolizinu proteolizės buferyje B [10 mM Tris–HCl (pH 7,5; 25°C), 100 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>] ir inkubuotas 1 h 25°C temperatūroje. BpuJI koncentracija proteolizės mišinyje buvo 0,3 mg/ml, DNR:BpuJI molinis santykis – 1,1:1, o proteazės:BpuJI masės santykis – 1:10. N-domeno/DNR kompleksas išgrynintas paeiliui panaudojant heparin-sefarozės ir Superdex 200 HR kolonėles.

**BpuJI sekos analizė.** Sanklodos atpažinimui naudotas Hhpred (<http://protevo.eb.tuebingen.mpg.de/hhpred>)<sup>12</sup>, homologų paieškai – PSI-BLAST<sup>13</sup>, sekų palyginimui – PCMA<sup>14</sup> ir ProbCons<sup>15</sup>.

**Kristalinimas ir difrakcijos duomenų surinkimas.** Kristalinimo eksperimentai buvo atliekami sėdinčio lašo metodu<sup>16</sup>, +19°C temperatūroje. Pradinei sąlygų paieškai naudoti tirpalai iš „Hampton Research“. Rentgeno spindulių difrakcijos duomenys surinkti EMBL/DESY, Hamburge, ir apdoroti programomis MOSFLM<sup>17</sup>, SCALA<sup>18</sup> bei TRUNCATE<sup>19</sup>.

**a) BpuJI kristalinimas.** BpuJI sukonzentruotas iki 2-5 mg/ml kristalinimo buferyje A [10 mM Tris–HCl (pH 7,5; 25°C), 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,02% NaN<sub>3</sub>]. Geriausi kristalai, gauti esant 100 mM Tris–HCl (pH 7,5; 25°C), 200 mM KCl, 9% PEG8000 ir 10 mM BaCl<sub>2</sub>, buvo polikristaliniai ir difragavo Rentgeno spindulius tik iki ~7 Å. Taip pat bandyta įdėti į koncentruotą preparatą 16/16(SP) DNR (1 lentelė), tačiau kristalų gauti nepavyko .

**b) N-domeno kristalinimas.** N-domeno/DNR kompleksas sukonzentruotas iki 6 mg/ml baltymo kristalinimo buferyje B [10 mM Tris–HCl (pH 7,5; 25°C), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,02% NaN<sub>3</sub>]. Pirmi kristalai išaugo lašuose, gautuose sumaišius 1 μl N-domeno komplekso su 16/16(SP) (1 lentelė) su 1 μl rezervuaro tirpalo [100 mM natrio citrato (pH 4,8), 20% PEG6000]. Jie difragavo Rentgeno spindulius iki ~2 Å, bet buvo polikristaliniai. Problemą pavyko išspręsti pakeitus DNR į 12/12(SP) (1 lentelė). Geriausi N-domeno komplekso su 12/12(SP) kristalai, gauti esant 0,2 M amonio tartrato/20% PEG3350, difragavo Rentgeno spindulius iki 1,3 Å. Prieš renkant duomenis kristalai buvo ~30 min mirkyti krio-tirpale A [0,2 M kalio natrio tartrato, 0,2 M NH<sub>4</sub>Cl, 20% PEG4000, 25% PEG400]. Siekiant įvesti gyvsidabrio atomus, kristalai ~savaite mirkyti Hg tirpale [2 mM HgCl<sub>2</sub>, 0,2 M amonio tartrato, 20% PEG3350, 15% PEG400]. Duomenų rinkiniai (2 lentelė) surinkti X12 spindulių linijoje.

**c) C-domeno kristalinimas.** C-domenas sukonzentruotas iki 1-2,5 mg/ml baltymo kristalinimo buferyje C [10 mM Tris–HCl (pH 8,0; 25°C), 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,02% NaN<sub>3</sub>]. Gražūs kristalai, išaugę esant 0,4 M natrio kalio tartrato arba 0,1 M MES (pH=6,5)/1,2 M natrio acetato, difragavo Rentgeno spindulius tik iki ~10 Å. Geriau difraguojančios (~3,0Å) mažos plokštelės buvo gautos esant 0,1 M natrio citrato (pH 3,8)/5% PEG6000. Pamirkus kristalus ~1 h krio-tirpale B [0,1 M natrio citrato (pH 3,8), 10% PEG6000, 25% PEG400], X11 spindulių linijoje buvo surinktas duomenų rinkinys, tačiau dėl prastos duomenų kokybės jų nepavyko apdoroti.

**Struktūros sprendimas.** BpuJI N-domeno komplekso su DNR struktūra išspręsta vieno bangos ilgio anomalios dispersijos (SAD) metodu. Gyvsidabrio atomų koordinatės nustatytos analizuojant Patersono žemėlapius HARA programa (S. Gražulis, nepublikuota). Fazės, apskaičiuotos MLPHARE<sup>20</sup>, pagerintos išlyginant tirpikli programa DM<sup>21</sup>. Pagal gautą elektroninio tankio žemėlapi programa ARP/wARP<sup>22</sup> sukurtas pradinis molekulės modelis, kuris toliau taisytas programomis Coot<sup>23</sup> ir CNS<sup>24</sup>. Panaudojus šį Hg-modifikuoto baltymo modelį, molekulinio pakeitimo būdu (programa AMORE<sup>20</sup>) išspręsta natyvaus komplekso struktūra. Galutinis modelis patikslintas iki  $R_{\text{work}}=0,138/R_{\text{free}}=0,166$  (REFMAC<sup>25</sup>), esant geriems stereocheminiams parametrams (įvertinta PROCHECK<sup>26</sup> ir WHAT IF<sup>27</sup>). Koordinatės ir struktūriniai faktoriai padėti į PDB duomenų bazę, kodas 2VLA.

## 2 lentelė. Duomenų surinkimo statistika

Duomenų rinkinys	Natyvus BpuJI N-domeno/DNR kompleksas	BpuJI N-domeno/DNR komplekso Hg-mirkinys
Temperatūra		100 K
Bangos ilgis		1,000 Å
Grupė		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Gardelės konstantos (Å)	56,2; 167,2; 43,8	59,0; 168,5; 43,8
Skiriamoji geba (Å)	83,6-1,30	84,2-1,80
Pilnumas (%)	98,2 (96,1) <sup>a</sup>	99,9 (99,9)
Kartotinumai	10,8 (8,0)	15,5 (15,3)
I/ $\sigma$ <sub>I</sub>	4,7 (2,4)	3,7 (2,6)
$R_{\text{merge}}$ <sup>b</sup>	0,082 (0,31)	0,11 (0,24)

<sup>a</sup>Skliausteliuose pateiktos reikšmės aukščiausios skiriamosios gebos duomenims.

<sup>b</sup> $R_{\text{merge}} = \sum |I_{hi} - \langle I_h \rangle| / \sum I_{hi}$ , kur  $I_{hi}$  – atspindžio h i-tojo matavimo intensyvumas, o  $\langle I_h \rangle$  – vidutinis atspindžio h intensyvumas.

**Klonavimas ir mutagenėzė.** Genų inžinerijos eksperimentai atlikti pagal įprastus protokolus<sup>28</sup>, naudojant UAB „Fermentas“ fermentus ir rinkinius bei PerfectPrep® DNR ekstrakcijos rinkinį (Eppendorf) pagal gamintojų rekomendacijas. BpuJI N-domeną koduojantis genas buvo padaugintas dviejų stadijų (megapradmens) metodu<sup>29</sup> panaikinant NdeI taikinį. Įterpus šį produktą į pET21b („Novagen“) tarp NdeI ir XhoI taikinių, buvo gauta plazmidė pET-BpuJINH. Spėjamų aktyvaus centro aminorūgščių mutagenėzė atlikta dviejų stadijų metodu<sup>29</sup>, o atpažinimo aminorūgščių – vienos stadijos metodu<sup>30</sup>. Tikslinių genų sekos patikrintos Sekoskaitos centre.

**Mutantinių baltymų gryninimas.** BpuJI N-domenas, turintis šešių histidino liekanų „inkarą“, ir jo mutantai buvo gauti *E.coli* ER2566 ląstelėse su pET-BpuJINH ir pACYC-MBpuJI plazmidėmis ir išgryninti panaudojant HiTrap gimingumo chromatografijos kolonėlę. BpuJI aktyvaus centro aminorūgščių mutantai ir K121A mutantas buvo išgryninti pagal laukinio tipo baltymo gryninimo schemą (žr. aukščiau).

**DNR karpymo tyrimai.** Visos DNR karpymo BpuJI, atskirtais jos domenais ir mutantais reakcijos atliktos reakcijos buferyje [50 mM Tris-HCl (pH 7,5; 25°C), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mg/ml of JSA] 25°C temperatūroje.

**a) PGR fragmentų karpymas.** Specifinis (203 bp) fragmentas buvo gautas PGR būdu, naudojant 5'-gccagggttttcccagtcacga ir 5'-gcttccggctcgtatgtgtg pradmenis (vienas iš pradmenų buvo pažymėtas radioaktyvia žyme), pUC57 matricą bei *Pfu* DNR polimerazę („Fermentas“). Analogiškai nuo pUC19 matricos padaugintas nespecifinis (179 bp) fragmentas. Fragmentai išgryninti panaudojant S-400 kolonėles. Hidrolizės reakcijos (1-2 nM DNR fragmento, 0,2-3 μM BpuJI) sustabdytos fenoliu/chloroformu, ir DNR izopropanoliu išsodinta iš vandeninės fazės. Padalinus DNR į dvi dalis, viena dalis paveikta T4 DNR polimeraze („Fermentas“). Pavyzdžiai analizuoti sekoskaitos geliuose<sup>11</sup> kartu sekoskaitos reakcijų produktais, gautais panaudojus tuos pačius žymėtus pradmenis ir CycleReader™ sekoskaitos rinkinį („Fermentas“).

**b) Oligodupleksų karpymas.** 2 nM žymėto oligoduplekso (1 lentelė) inkubuota su 100 nM C-domeno. Produktai atskirti elektroforeze denatūruojančiuose poliakrilamido/TBE geliuose<sup>11</sup>. Žinomo dydžio fragmentai gauti karpant 37/37 oligodupleksą XbaI, Acc65I, EcoRI, BamHI, Ecl136II ir S1 nukleaze („Fermentas“).

**DNR surišimo tyrimas.** Žymėti oligodupleksai (1 lentelė) sumaišyti su tiriamais baltymais susirišimo buferyje [30 mM MES (pH 6,5), 30 mM histidino, 10% glicerolio, 0,2 mg/ml JSA]. Kompleksai nuo laisvos DNR atskirti vykdant elektroforezę 8% poliakrilamido geliuose natyviomis sąlygomis [30 mM MES (pH 6,5), 30 mM histidino]. Disociacijos konstantos ( $K_d$ ) apskaičiuotos pagal lygtį:

$$y = \{s_0 + x + K_d - [(s_0 + x + K_d)^2 - 4s_0x]^{0.5}\} / 2,$$

kur  $y$  – baltymo/DNR komplekso koncentracija (nM),  $x$  – bendra baltymo koncentracija,  $s_0$  – bendra DNR koncentracija. Duomenys analizuoti programa KyPlot<sup>31</sup>.

**Analitinė gel-filtracija.** BpuJI ir proteolitiniai fragmentai užnešti ant SuperSW 2000 kolonėlės, nulygsvarintos gel-filtracijos buferiu A [0,1 M natrio fosfato (pH 6,7), 0,1 M natrio sulfato]. Baltymų-DNR kompleksų gel-filtracijai naudota Superdex 200 HR kolonėlė, nulygsvarinta gel filtracijos buferiu B [50 mM Tris-HCl (pH 7,5; 25°C), 0,1 M KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>]. Molekulinės masės buvo apskaičiuotos pagal kalibracinės tiesės, gautas išmatavus standartinių baltymų (“Bio-Rad”) eliucijos tūrius.

**Analitinis ultracentrifugavimas.** Sedimentacijos pusiausvyros eksperimentai buvo atlikti Beckman/Coulter XLA analitinėje centrifugoje. Pavyzdžiai (1,6 μM, 3,2 μM ir 6,4 μM BpuJI) ultracentrifugavimo buferyje [10 mM Tris-HCl (pH 7,5; 25°C), 0,2 M KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTT] centrifuguoti 12000 aps/min greičiu mažiausiai 18 h, matuojant absorbcijos profilius (280 nm). Molekulinės masės pagal profilius buvo apskaičiuotos kaip aprašyta anksčiau<sup>32</sup>.

## 2 Rezultatai ir jų aptarimas

### 2.1 *BpuJI* funkcinis charakterizavimas

#### 2.1.1 Preliminarūs eksperimentai

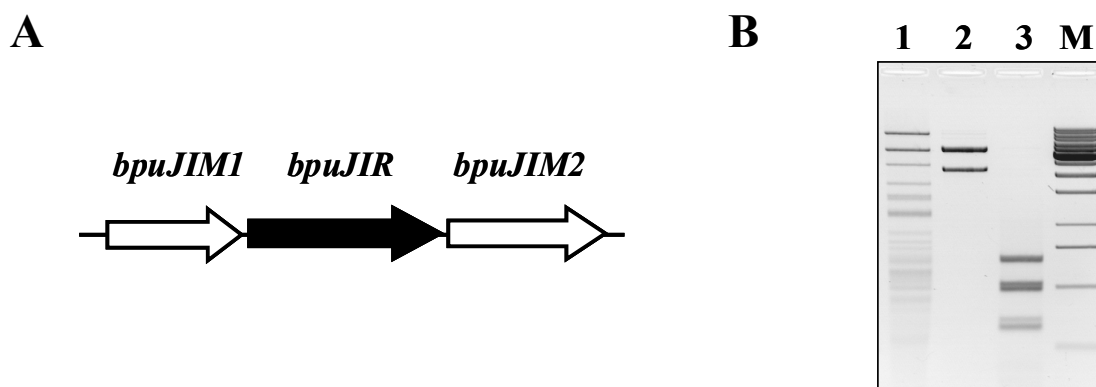
Restrikcijos endonukleazė *BpuJI* iš *Bacillus pumilus* RFL1458 kamieno atpažįsta 5'-CCCGT seką (K. Stankevičius, nepublikuota). *BpuJI* R-M sistemą sudaro trys genai, iš kurių vienas koduoja restrikcijos endonukleazę (GenBank:EF409421), o du – 5-metilcitozino metiltransferazes (1 pav., A) (K. Stankevičius, nepublikuota). Tokia genų organizacija yra panaši į IIS tipo R-M sistemų genų organizaciją<sup>1</sup>.

*BpuJI* karmo bakteriofagų ir plazmidinę DNR į fragmentus, kurie turėtų susidaryti karpant 5'-CCCGT sekose arba šalia jų (1 pav., B), bet sekoskaitos būdu analizuojant gautus DNR fragmentus nepavyko nustatyti *BpuJI* kirpimo vietas.

#### 2.1.2 Variabili *BpuJI* kirpimo vieta

Siekdami nustatyti *BpuJI* kirpimo vietą, mes PGR būdu padauginome pUC57 plazmidės regioną, viduryje turintį vieną *BpuJI* taikinį, ir vieną iš fragmento grandinių pažymėjome radioaktyvia žyme 5'-gale. Gautas specifinis 203 bp ilgio PGR fragmentas buvo inkubuotas su *BpuJI* ir po tam tikro laiko susidarę reakcijos produktai analizuoti sekoskaitos geliuose. Šį fragmentą *BpuJI* karpė lėtai: substratas buvo pilnai sukarpomas per kelias valandas tik esant didelėms fermento koncentracijoms.

Analizė parodė, kad *BpuJI* karmo viršutinę DNR grandinę keliose vietose (2 pav., A). Be to, reakcijos produktai keičiasi ilgėjant reakcijos mišinio inkubacijos laikui. Po 5 bei 20 min inkubacijos stebima daug fragmentų, kurių ilgiai rodo kirpimą nuo 2 iki 25 nt 3'-kryptimi nuo taikinio. Daugiausia iš šių fragmentų yra perkirpti 2 ir 11 nt 3'-kryptimi nuo *BpuJI* taikinio. Tuo tarpu pagrindinis fragmentas, susidarantis ilgiau inkubuojant (2 ir 5 h), yra perkirptas 18 nt 5'-kryptimi nuo taikinio. Taigi *BpuJI* kerpa viršutinę DNR



1 pav. (A) *BpuJI* R-M sistemos genų organizacija. Restrikcijos endonukleazę koduojantis genas *bpuJIR* yra tarp dviejų 5-metilcitozino metiltransferazes koduojančių genų, *bpuJIM1* ir *bpuJIM2*. (B) *BpuJI* sukarchyta bakteriofago  $\lambda$  (1 takelis), bakteriofago  $\Phi X174$  (2 takelis) ir pUC57 (3 takelis) DNR. 20  $\mu\text{g/ml}$  DNR inkubuota su 100 nM *BpuJI* 1 h 37°C temperatūroje, produktai atskirti 1% agarozės gelyje. M takelis– DNR ilgio žymenys.

grandinę iš abiejų taikinio pusių, bet pradžioje – 3'-kryptimi nuo atpažinimo sekos. Apatinę grandinę BpuJI taip pat kerpa daugelyje vietų (2 pav., B): iš pradžių (po 5 ir 20 min) 6, 7, 13, 15, 16, 19 and 23 nt 5'-kryptimi nuo taikinio, o po ilgesnės inkubacijos (2 ir 5 h) lieka produktai, perkirpti 19 ir 23 nt 5'-kryptimi nuo atpažinimo sekos. Kadangi radioaktyvi žymė yra 5'-gale, iš šių duomenų nėra aišku, ar apatinė grandinė nėra kerpama ir 3'-kryptimi kaip viršutinė.

Siekiant patikrinti, ar BpuJI hidrolizuoja abi grandines iš abiejų taikinio pusių, buvo panaudota T4 DNR polimerazė. Ši polimerazė užpildo 5'-lipnius ir hidrolizuoja 3'-lipnius galus, tokiu būdu suformuodama DNR fragmentą bukais galais. Specifinis PGR fragmentas, kurio viršutinė grandinė pažymėta radioaktyvia žyme 5'-gale, buvo perkirptas BpuJI ir po to paveiktas T4 DNR polimeraze. Taip buvo gautas ilgesnis fragmentas, patvirtinantis, kad BpuJI kerpa apatinę grandinę 5'-kryptimi nuo taikinio (2 pav., C). Taip pat susidarė ir trumpesni fragmentai, kurie rodytų, kad apatinė grandinė yra kerpama ir 13, 16 nt 3'-kryptimi nuo taikinio.

Kitą specifinį PGR fragmentą su skirtinga BpuJI taikinio 5'-CCCGT apsuptimi BpuJI taip pat hidrolizavo keliose vietose iš abiejų taikinio pusių, tačiau atstumai nuo pagrindinių kirpimo vietų iki taikinio skyrėsi (duomenys nepateikti). Taigi, BpuJI abi DNR grandines hidrolizuoja iš abiejų taikinio pusių, o kirpimo vieta yra labai variabili.

### **2.1.3 BpuJI optimaliam aktyvumui reikalingi du taikiniai**

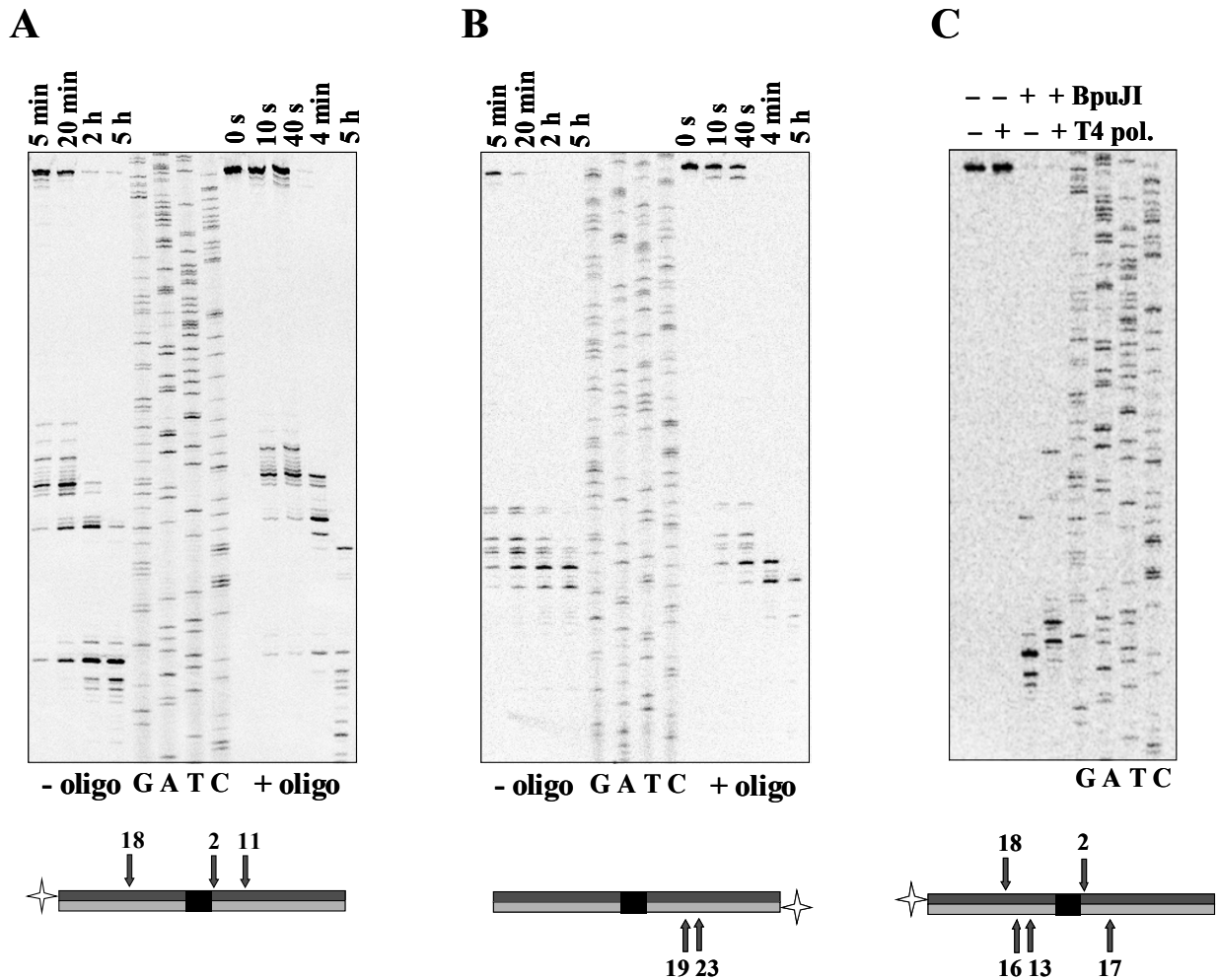
Dauguma IIS tipo restrikcijos endonukleazių didžiausiu katalitiniu aktyvumu pasižymi sąveikaudamos su dviem taikinio kopijomis, o vieną taikinį turinčią DNR hidrolizuoja lėtai<sup>33-35</sup>. Tokių fermentų aktyvumas karpant vieną taikinį turinčią DNR dažnai gali būti stimuliuojamas specifiniu oligodupleksu. Toks oligodupleksas užima antro taikinio vietą ir tokiu būdu pagreitina vieną taikinį turinčio substrato karpymą<sup>35-37</sup>.

Siekdami patikrinti, ar BpuJI optimaliam katalitiniam aktyvumui reikalingi du taikiniai, mes pabandėme stimuliuoti vieną taikinį turinčio PGR fragmento karpymą specifiniu oligodupleksu. Pridėjus 16/16(SP) oligoduplekso (1 lentelė), BpuJI 5'-gale žymėtą 203 bp PGR fragmentą iš tiesų karpė žymiai greičiau – jau po kelių minučių nebeliko neperkirsto substrato (2 pav.). Tačiau, kaip ir nesant oligoduplekso, abi grandinės buvo hidrolizuojamos keliose vietose šalia taikinio.

### **2.1.4 Nuo 3'-galo priklausomas nukleazinis aktyvumas**

Karpant 203 bp fragmentą BpuJI esant specifinio oligoduplekso, kartu su perkirptais šalia taikinio fragmentais susidaro ir kiti tarpiniai produktai. Šie produktai atitiktų fragmentą, perkirptą kelių nt atstumu nuo 3'-galo. Jie susidaro ir nesant oligoduplekso, nors ir lėčiau. Siekiant patikrinti, ar BpuJI taip hidrolizuoja ir taikinio neturinčią DNR, buvo panaudotas nespecifinis 179 bp ilgio PGR fragmentas, kurio viršutinė grandinė buvo 5'-gale pažymėta radioaktyvia žyme.

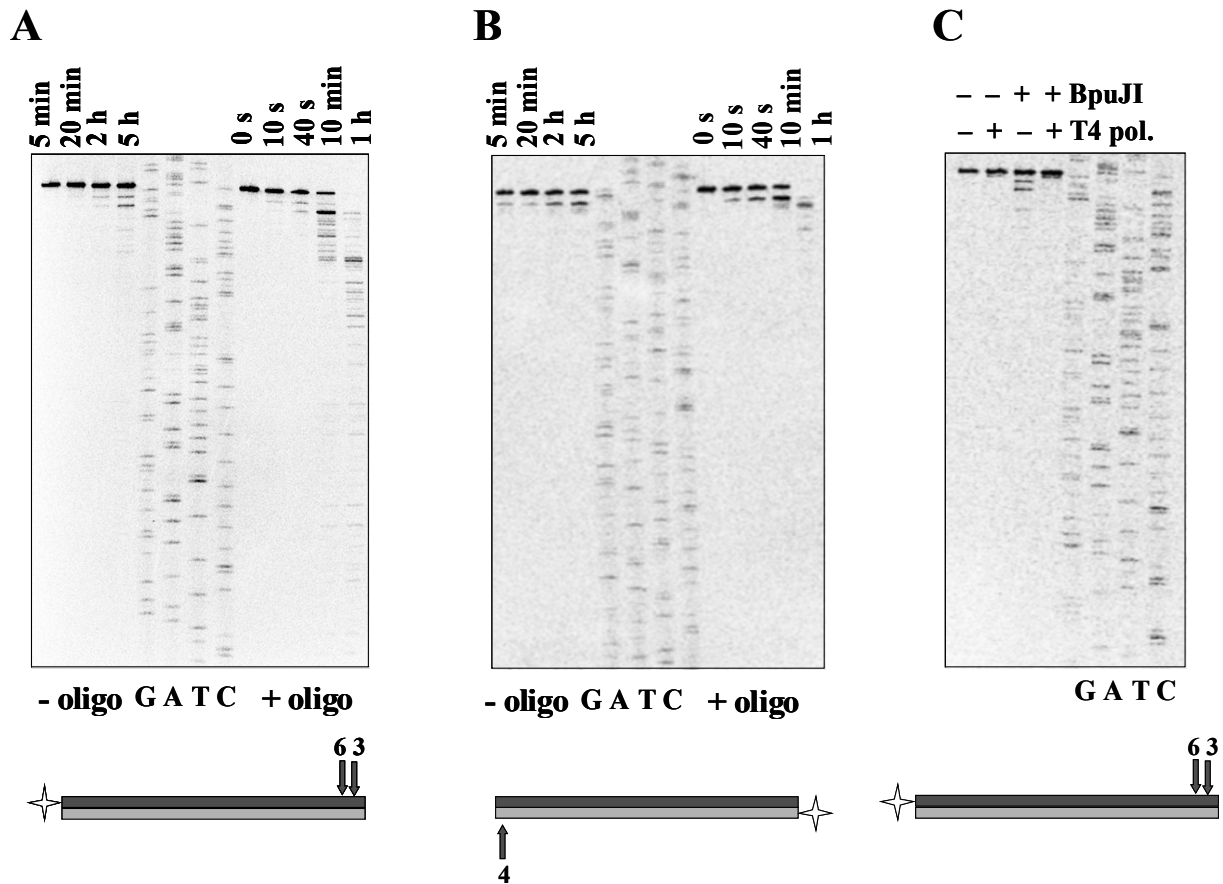
Šis fragmentas buvo inkubuojamas su BpuJI taip pat kaip ir taikinį turintis substratas. Karpymo produktų analizė parodė, kad abi nespecifinio fragmento grandinės nėra kerpamos per 5 ir 20 min, o po ilgesnės inkubacijos matosi neryškios juostelės, kurios juostelės atitinka fragmentus, perkirptus netoli 3'-galo: 3 ir 6 nt nuo 3'-galo viršutinėje grandinėje, 4 nt – apatinėje (3 pav., A, B). Paveikus susidariusius produktus T4 DNR



2 pav. Specifinio PGR fragmento karpymas *BpuJI*. 1 nM PGR fragmento, kurio viršutinė (A) arba apatinė (B) grandinė 5'-gale pažymėta radioaktyvia žyme, inkubuota su 3  $\mu$ M *BpuJI*, esant ekvimoliariniam kiekiui 16/16(SP) oligoduplekso arba be jo. Po tam tikro laiko (nurodyta virš atitinkamų takelių) paimti mėginiai analizuoti elektroforeze sekoskaitos geliuose kartu su sekoskaitos reakcijų produktais (takeliai G, A, T, C). (C) *BpuJI* karpymo produktai, paveikti T4 DNR polimeraze. 1 nM specifinio PGR fragmento, kurio viršutinė grandinė buvo pažymėta radioaktyvia žyme 5'-gale, inkubuota su 1,5  $\mu$ M *BpuJI* 5 h. Reakcija sustabdyta fenoliu/chloroformu, DNR išsodinta ir padalinta į dvi dalis, iš kurių viena paveikta T4 DNR polimeraze. Produktai analizuoti sekoskaitos geliuose. Schemose *BpuJI* atpažinimo seka pavaizduota stačiakampiu,  $^{33}$ P žymė – žvaigždute, o pagrindinės kirpimo vietos – rodyklėmis, virš jų nurodant atstumą nuo taikinio.

polimeraze, buvo gautos pilno ilgio grandinės (3 pav., C). Tai rodytų, kad tik žymėta grandinė yra kerpama nuo 3'-galo, o komplementari grandinė nuo 5'-galo nėra karpoma. *BpuJI* taikinį turintis oligodupleksas ženkliai stimuliuoja šį nuo 3'-galo priklausomą DNR karpymą. Esant 16/16(SP) oligoduplekso, jau po 10 min visas nespecifinis PGR fragmentas buvo sukarpytas.

Taigi, *BpuJI* karmo DNR ne tik šalia taikinio, bet ir kelių nukleotidų atstumu nuo 3'-galo. *BpuJI* taikinis stimuliuoja nuo 3'-galo priklausomą nukleazinį aktyvumą. Todėl DNR karpymo pobūdis šalia *BpuJI* taikinio yra kintamas ir sudėtingas. Be to, *BpuJI* nuo



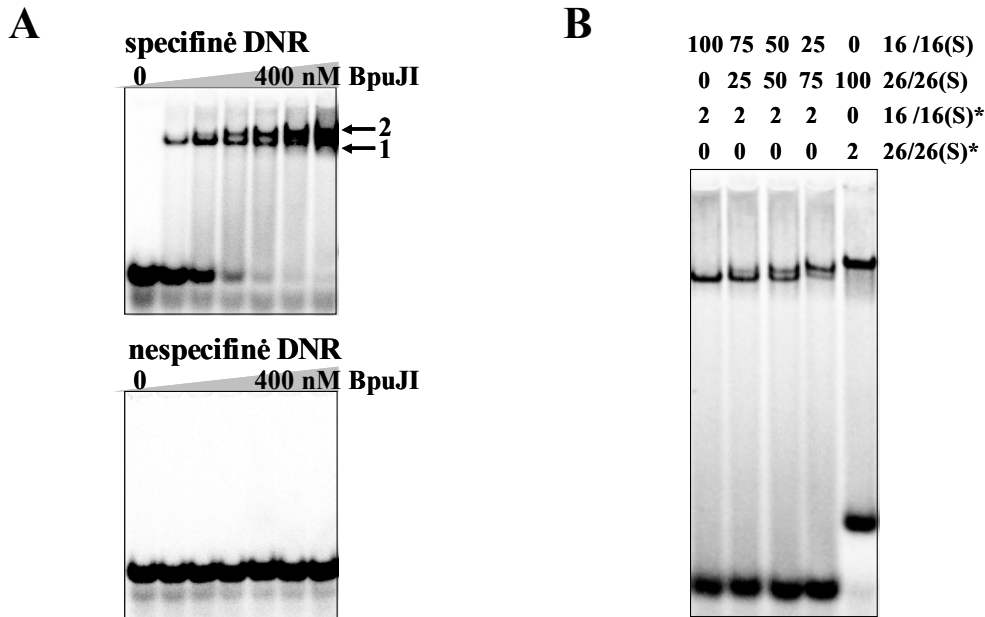
3 pav. Nespecifinio PGR fragmento karpymas *BpuJI*. 1 nM PGR fragmento, kurio viršutinė (A) arba apatinė (B) grandinė 5'-gale pažymėta radioaktyvia žyme, inkubuota su 3  $\mu$ M *BpuJI*, esant ekvimoliariniam kiekiui 16/16(SP) oligoduplekso arba be jo. Po tam tikro laiko (nurodyta virš atitinkamų takelių) paimti mėginiai analizuoti elektroforeze sekoskaitos geliuose kartu su sekoskaitos reakcijų produktais (takeliai G, A, T, C). (C) *BpuJI* karpymo produktai, paveikti T4 DNR polimeraze. 1 nM nespecifinio PGR fragmento, kurio viršutinė grandinė pažymėta radioaktyvia žyme 5'-gale, inkubuota su 1,5  $\mu$ M *BpuJI* 5 h. Reakcija sustabdyta fenoliu/chloroformu, DNR išsodinta ir padalinta į dvi dalis, iš kurių viena paveikta T4 DNR polimeraze. Produktai analizuoti sekoskaitos geliuose. Schemose  $^{33}\text{P}$  žymės padėtis yra parodyta žvaigždute, o pagrindinės kirpimo vietos – rodyklėmis, virš jų nurodant atstumą nuo 3'-galo.

3'-galo gali karchyti ir taikinio neturinčią DNR molekulę, kas ypač pasireiškia esant aktyvuojančiai specifinei DNR.

### 2.1.5 *BpuJI* vienu metu gali surišti du taikinius

Norėdami patikrinti, ar *BpuJI* gali surišti du DNR taikinius, mes atlikome elektroforezinio judrumo poslinkio eksperimentus naudodami  $^{33}\text{P}$ -žymėtu oligodupleksus: specifinį 16/16(SP) arba nespecifinį 16/16 (1 lentelė). Eksperimentai buvo atlikti nesant kofaktoriaus  $\text{Mg}^{2+}$  jonų, kad DNR nebūtų karpoma. Analizuojant pavyzdžius elektroforeze poliakrilamido gelyje buvo stebimi du skirtingo elektroforezinio judrumo *BpuJI* ir 16/16(SP) kompleksai, 1 ir 2 (4 pav., A). Su taikinio neturinčia 16/16 DNR kompleksas nesusidarė, kas rodytų kad kompleksai 1 ir 2 susidaro *BpuJI* sąveikaujant su atpažinimo seka. Esant mažesnėms baltymo koncentracijoms





4 pav. (A) BpuJI DNR surišimo tyrimas. 2 nM specifinio 16/16(SP) (viršutinis gelis) arba nespecifinio 16/16 (apatinis gelis) žymėto oligoduplekso buvo sumaišyta su BpuJI taip, kad galutinės BpuJI koncentracijos būtų 0, 8, 16, 40, 80, 160 arba 400 nM. Pavyzdžiai analizuoti elektroforeze poliakrilamido gelyje natyviomis sąlygomis. (B) BpuJI/DNR komplekso analizė. 100 nM BpuJI sumaišyta su 16/16(SP) ir 26/26(SP) oligodupleksais. Radioaktyvia žyme žymėtų (žymė parodyta žvaigždute) ir nežymėtų oligodupleksų koncentracijos nurodytos virš atitinkamų takelių. Pavyzdžiai analizuoti elektroforeze poliakrilamido gelyje natyviomis sąlygomis.

susidaro didesnio elektroforezinio judrumo 1 kompleksas, o pridėjus daugiau baltymo – ir mažiau judrus kompleksas 2. “Aktyvacija oligodupleksu” rodo, kad BpuJI gali sąveikauti su dviem taikiniais vienu metu. Todėl kompleksas 1 galėtų atitikti BpuJI kompleksą su dviem DNR molekulėmis, o kompleksas 2 – su viena, kaip anksčiau buvo parodyta Sfil ir Bfil REazėms<sup>35, 38</sup>.

Siekiant tiesiogiai patikrinti, ar BpuJI sudaro kompleksą su dviem DNR molekulėmis, buvo panaudoti skirtingo ilgio oligodupleksai, 16/16(SP) ir 26/26(SP). Šie oligodupleksai buvo sumaišyti įvairiais santykiais ir prie jų pridėjama BpuJI, išlaikant 1:1 molinį santykį tarp bendros DNR ir baltymo koncentracijų. Nedidelė 16/16(SP) ar 26/26(SP) dalis buvo žymėta radioaktyvia žyme. Paaiškėjo, kad esant vienos rūšies DNR, BpuJI sudaro vieną kompleksą (4 pav., B). Be to, kompleksų su skirtingo ilgio 16/16(SP) ir 26/26(SP) oligodupleksais elektroforezinis judrumas skiriasi. Tuo tarpu, inkubuojant BpuJI su žymėta 16/16(SP) DNR, reakcijos mišinyje esant nežymėtos 26/26(SP) DNR, susidaro naujas kompleksas. Šio komplekso elektroforezinis judrumas yra mažesnis nei komplekso su 16/16(SP), bet didesnis nei komplekso su 26/26(SP), o jo kiekis priklauso nuo 16/16(SP) ir 26/26(SP) molinio santykio. Tai rodo, kad BpuJI gali sudaryti kompleksą su dviem DNR molekulėmis: žymėta 16/16(SP) ir nežymėta 26/26(SP). Taigi, BpuJI vienu metu gali sąveikauti su dviem taikiniais.

## 2.2 BpuJI struktūrinė organizacija

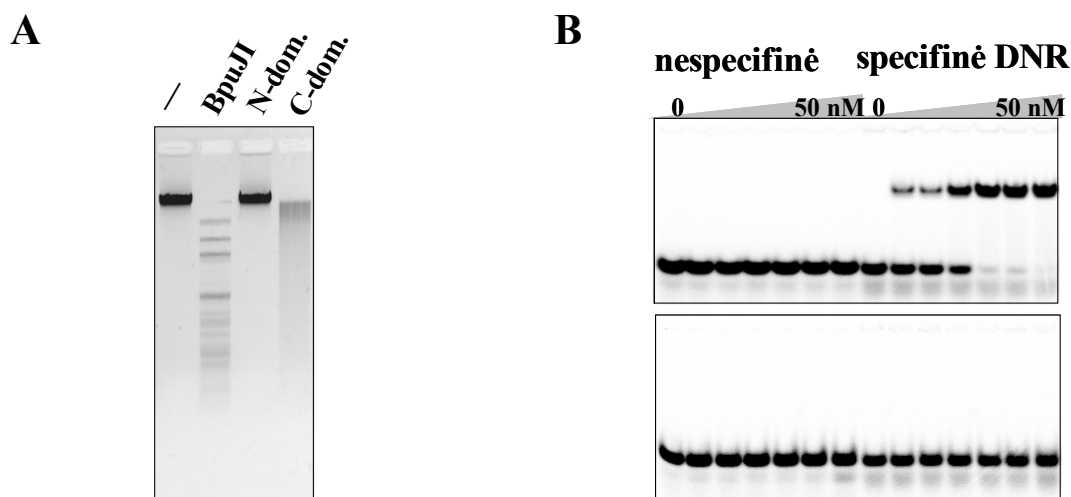
### 2.2.1 BpuJI tirpale yra dimeras

Daug IIS tipo restrikcijos endonukleazių tirpale yra monomerai<sup>39-41</sup>, bet dimerizuojasi sąveikaudamos su DNR<sup>33, 42</sup>. Kita vertus, BfiI yra dimeras tiek tirpale, tiek baltymo/DNR komplekse<sup>35</sup>. BpuJI monomero molekulinė masė, apskaičiuota pagal aminorūgščių seką, yra lygi 53,9 kDa, o prof. Claus Urbanke (Hannover Medizinische Hochschule) atlikus sedimentacijos pusiausvyros eksperimentus buvo nustatyta 109 kDa molekulinė masė. Taigi, šie duomenys rodo, kad BpuJI tirpale yra dimeras.

### 2.2.2 BpuJI monomeras turi atskirus domenų atpažinimui ir katalizei

BpuJI karmo DNR toli nuo atpažinimo sekos, todėl ji, kaip ir IIS tipo REazės FokI ir BfiI<sup>5, 7</sup>, galėtų turėti atskirus domenų atpažinimui ir katalizei. Siekiant patikrinti šią hipotezę, buvo atlikti dalinės proteolizės eksperimentai. Karpant BpuJI chimotripsinu buvo gauti ~35 kDa ir ~20 kDa fragmentai. Nustačius jų N-galinių aminorūgščių sekas, paaiškėjo, kad ~35 kDa fragmentas atitinka BpuJI N-galinę dalį, o mažesnis – C-dalį. Šių fragmentų molekulinės masės, nustatytos gel-filtracijos būdu, atitinkamai buvo lygios ~38 kDa ir ~49 kDa. Tai rodytų, kad N-galinis fragmentas tirpale yra monomeras, o C-galinis fragmentas – dimeras. Taigi, BpuJI monomeras greičiausiai yra sudarytas iš dviejų struktūrinių domenų ir dimerizuojasi sąveikaujant C-galiniams domenams.

Išgryninti BpuJI domenai su DNR sąveikauja skirtingai nei pilno ilgio baltymas. N-galinis domenas DNR nekarmo, tuo tarpu C-galinis domenas karmo DNR palikdamas „šliužę“ – kaip nespecifinės nukleazės, o ne fiksuoto ilgio fragmentus kaip REazės (5 pav., A). Atlikus DNR surišimo eksperimentus paaiškėjo, kad tik N-galinis domenas



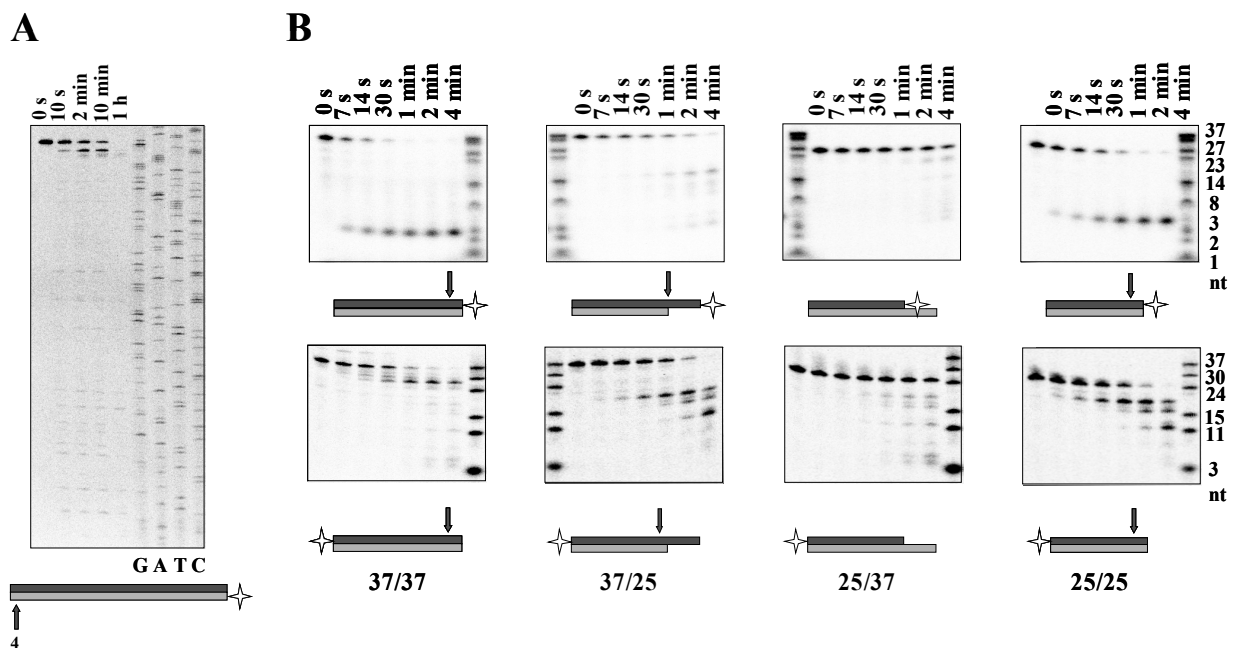
5 pav. BpuJI domenų sąveikos su DNR tyrimas. (A)  $\lambda$  DNR karpymas. 20  $\mu\text{g/ml}$  DNR inkubuota su BpuJI, N-domenu arba C-domenu (galutinė baltymo koncentracija buvo 25 nM) 1 h 37°C temperatūroje, produktai atskirti elektroforeze 1% agarozės gelyje. (B) DNR surišimo tyrimas. 2 nM specifinio 16/16(SP) arba nespecifinio 16/16 žymėto oligoduplekso sumaišyta su BpuJI N-domenu (viršutinis gelis) arba C-domenu (apatinis gelis) taip, kad galutinės baltymo koncentracijos būtų 0, 1, 2, 5, 10, 20 arba 50 nM. Pavyzdžiai analizuoti elektroforeze poliakrilamido gelyje natyviomis sąlygomis.

sudaro kompleksą su specifine DNR (5 pav., B). Tokie rezultatai rodo, kad BpuJI domenai turi skirtingas funkcijas: N-domenas atpažįsta 5'-CCCGT seką, o C-domenas pasižymi nukleaziniu aktyvumu.

### 2.2.3 Nuo 3'-galo priklausomas C-domeno nukleazinis aktyvumas

Atskirtas BpuJI C-domenas nespecifinį 179 bp PGR fragmentą, pažymėtą radioaktyvia žyme, karpoma labai panašiai kaip ir specifiniu oligodupleksu aktyvuotas pilno ilgio baltymas. Žymėta apatinė grandinė perkerpama 4 nt atstumu nuo 3'-galo ir toliau karpoma (6 pav., A). Tai rodo, kad pilno ilgio baltymo nuo 3'-galo priklausomą nukleazinį aktyvumą lemia C-galinio domeno savybės.

Detalesniems nuo 3'-galo priklausomo nukleazinio aktyvumo tyrimams buvo paruošti BpuJI taikinio neturintys substratai su skirtingais galais: 37/37 ir 25/25 oligodupleksai bukais galais, 37/25 oligodupleksas 3'-lipniu galu bei 25/37 oligodupleksas 5'-lipniu galu (1 lentelė). Viršutinė šių oligodupleksų grandinė buvo pažymėta radioaktyvia žyme 5'- arba 3'-gale. Paveikus 3'-gale žymėtą 37/37 substratą BpuJI C-domeno buvo gautas vienas ~3 nt ilgio produktas (6 pav., B). Tai patvirtina, kad BpuJI C-domenas nukerpa kelis nukleotidus nuo dvigrandės DNR 3'-galo. Jeigu ta pati 37/37 oligoduplekso grandinė yra pažymėta 5'-gale, matosi, kad ji yra karpoma toliau ir susidaro mažesni



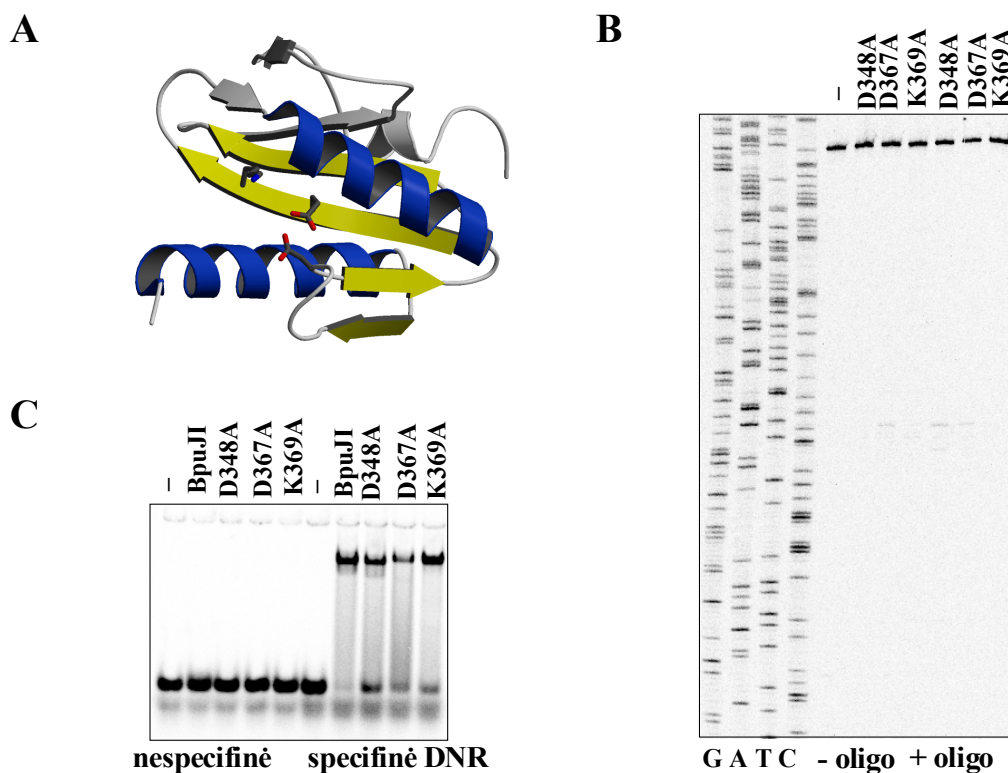
6 pav. (A) PGR fragmento karpymas BpuJI C-domeno. 1 nM PGR fragmento, kurio apatinė grandinė 5'-gale pažymėta radioaktyvia žyme, inkubuota su 3  $\mu$ M C-domeno +4°C temperatūroje. Po tam tikro laiko (nurodyta virš atitinkamų takelių) paimti mėginiai analizuoti elektroforeze sekoskaitos geliuose kartu su sekoskaitos reakcijų produktais (takeliai G, A, T, C). Schemoje <sup>33</sup>P žymė pavaizduota žvaigždute, o pagrindinė kirpimo vieta 4 nt nuo 3'-galo – rodykle. (B) Oligodupleksų karpymas BpuJI C-domeno. 2 nM vieno iš oligodupleksų (1 lentelė), kurio viršutinė grandinė pažymėta 3'-gale (viršutiniai geliai) arba 5'-gale (apatiniai geliai) inkubuota su 100 nM C-domeno 25°C temperatūroje. Po tam tikro laiko (nurodyta virš atitinkamų takelių) paimti mėginiai analizuoti elektroforeze poliakrilamido geliuose denatūruojančiomis sąlygomis. Schemose radioaktyvios žymės padėtis parodyta žvaigždute, o kirpimo vietos – rodyklėmis.

fragmentai. 3'-išsikišusi 37/25 oligoduplekso viršutinė grandinė taip pat buvo karpoma, bet lėčiau, o kirpimo vieta buvo dvigrandėje substrato dalyje. 25/37 oligodupleksas 5'-išsikišusiu galu buvo C-domeno karpomas lėčiausiai, nors tokia pati viršutinė grandinė 25/25 oligoduplekse buvo gana greitai karpoma, nukerpant ~4 nt nuo 3'-galo. Taigi, BpuJI C-domenas yra linkęs hidrolizuoti dvigrandę DNR bukais galais, nukirpdamas ~3 nt nuo 3'-galo.

## 2.2.4 BpuJI C-domenas turi PD-(D/E)XK struktūrinę sanklodą

Sanklodos atpažinimo metodu dr. Česlovas Venclovas (Biotechnologijos institutas) parodė, kad BpuJI C-domenas yra labiausiai panašus į archėjų Holidėjaus jungtis kerpančias nukleazes Hjc/Hje<sup>43-45</sup> (7 pav., A), kurios turi PD-(D/E)XK struktūrinę sanklodą<sup>46, 47</sup>. Be to, palyginus BpuJI ir Hjc/Hje nukleazių aminorūgščių sekas, paaiškėjo, kad BpuJI aktyvų centrą galėtų sudaryti YD<sup>348</sup>...E<sup>367</sup>VK<sup>369</sup> motyvo aminorūgštys.

Siekiant patikrinti šią hipotezę, Asp348, Glu367 ir Lys369 buvo kryptingai pakeistos alaninu. Pakeitus vieną iš šių aminorūgščių, BpuJI katalitinis aktyvumas ženkliai



7 pav. (A) Hjc nukleazės erdvinė struktūra (PDB:1gef)<sup>43</sup>.  $\beta$ -juostos ir  $\alpha$ -spiralės, kurios sudaro PD-(D/E)XK nukleazių struktūrinę šerdį, pavaizduotos atitinkamai geltonai ir mėlynai bei parodytos aktyvų centrą sudarančių aminorūgščių šoninės grandinės. (B) Specifinio PGR fragmento karpymas BpuJI D348A, E367A ir K369A mutantais. 1 nM PGR fragmento, kurio viršutinė grandinė pažymėta 5'-gale, inkubuota su 3  $\mu$ M baltymo, esant ekvimoliariniam kiekiui 16/16(SP) oligoduplekso arba be jo. Produktai atskirti elektroforeze sekoskaitos gelyje kartu su sekoskaitos reakcijų produktais (takeliai G, A, T, C). (C) BpuJI mutantų DNR surišimo tyrimas. 100 nM baltymo buvo sumaišyta su 2 nM žymėto specifinio 16/16(SP) arba nespecifinio 16/16 oligoduplekso, esant 100 nM nežymėtos DNR. Pavyzdžiai analizuoti elektroforeze poliakrilamido gelyje natyviomis sąlygomis.

sumažėjo. D348A, E367A ir K369A mutantai specifinį PGR fragmentą šalia taikinio karpė labai silpnai (7 pav., B), taip pat jie nepasižymėjo ir nuo 3'-galo priklausomu nukleaziniu aktyvumu. Tačiau šie mutantai sudarė kompleksą su specifine DNR (7 pav., C), kas rodo, kad jie gali atpažinti taikinį, bet prastai hidrolizuoja DNR. Tokie rezultatai patvirtina, kad Asp348, Glu367 ir Lys369 greičiausiai sudaro BpuJI aktyvų centrą.

### 2.2.5 BpuJI N-domenas su taikiniu sąveikauja kaip monomeras

Nors atskirtas BpuJI N-domenas tirpale yra monomeras (2.2.2), jis galėtų dimerizuotis sąveikaudamas su taikiniu kaip, pavyzdžiui, SdaI atpažinimo domenas<sup>48</sup>. Todėl gel-filtracijos būdu mes nustatėme N-domeno komplekso su specifiniu oligodupleksu 16/16(SP) molekulinę masę. Ji buvo lygi ~54 kDa. Nesant specifinės DNR, N-domenas yra išplaunamas iš kolonėlės kaip ~40 kDa baltymas, todėl ~54 kDa komplekso molekulinė masė rodo, kad N-domenas greičiausiai sąveikauja su specifine DNR (10,7 kDa) kaip monomeras.

### 2.2.6 BpuJI ir jo domenų kristalinimas

Norėdami išspręsti erdvinę BpuJI struktūrą, mes kristalinome BpuJI ir jos kompleksą su įvairiais oligodupleksais (duomenys nepateikti). Deja, geriausi BpuJI kristalai difragavo Rentgeno spindulius tik iki ~7 Å ir nebuvo tinkami rentgenostruktūrinei analizei. Todėl pabandėme gauti atskirų BpuJI domenų kristalus. BpuJI C-domeno kristalai taip pat nebuvo tinkami struktūros nustatymui, tuo tarpu N-domeno komplekso su 16/16(SP) (1 lentelė) kristalai difragavo iki ~2 Å, bet buvo polikristalai. Pavienius kristalus pavyko gauti pakeitus 16/16(SP) trumpesniu 12/12(SP) oligodupleksu. Šie kristalai difragavo Rentgeno spindulius iki beveik atominės skiriamosios gebos ir leido išspręsti N-domeno/DNR komplekso erdvinę struktūrą. Kristalinimo rezultatai apibendrinti 3 lentelėje.

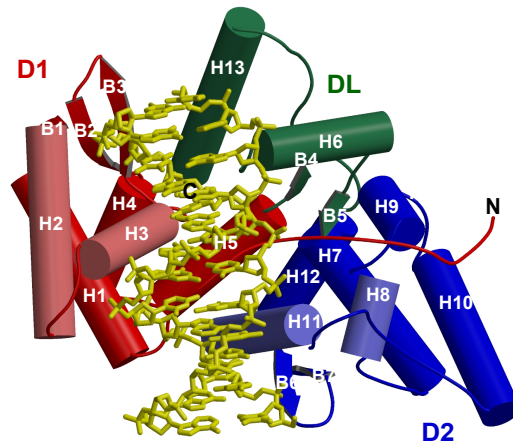
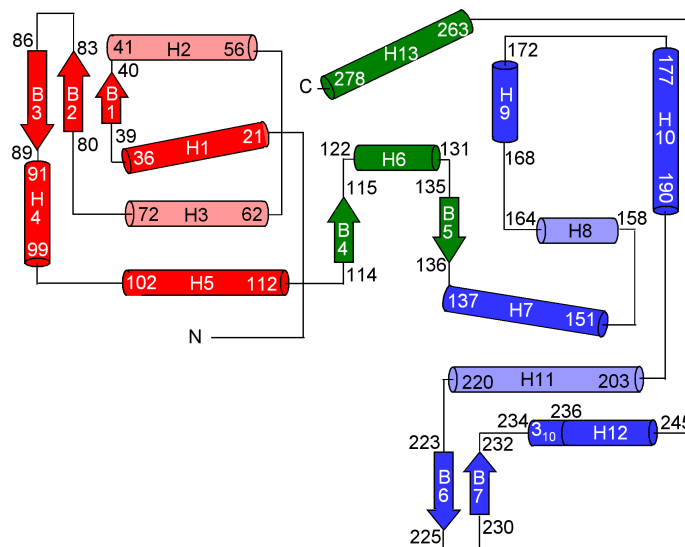
#### 3 lentelė. BpuJI ir jos atskirų domenų kristalai

Baltymas	DNR	Kristalai*	Skiriamoji geba, Å*
BpuJI	–	polikristalai	~7
BpuJI	16/16(SP)	–	–
C-domenas	–	pavieniai kristalai	~10
C-domenas	–	plonos plokštelės	~3
N-domenas	16/16(SP)	polikristalai	~2
<b>N-domenas</b>	<b>12/12(SP)</b>	<b>pavieniai kristalai</b>	<b>1.3</b>

\*detalios kristalinimo sąlygos ir Rentgeno spindulių difrakcijos duomenų surinkimo statistika pateikta „Tyrimų metodikoje“.

### 2.2.7 BpuJI N-domeno/DNR komplekso erdvinė struktūra

BpuJI N-domeno komplekso su DNR erdvinė struktūra buvo išspręsta vieno bangos ilgio anomalios dispersijos (SAD) metodu, modifikavus baltymą gyvsidabrio jonais. Struktūra patikslinta iki 1,3 Å skiriamosios gebos ir  $R_{\text{work}}=0,138/R_{\text{free}}=0,166$ . Kaip ir buvo tikėtasi pagal gel-filtracijos rezultatus (2.2.5), struktūroje matomas N-domeno

**A****B**

8 pav. (A) *BpuJI* N-domeno komplekso su DNR erdvinė struktūra. D1, D2 ir DL subdomenai nuspalvinti atitinkamai raudonai, mėlynai ir žaliai, D1 ir D2 subdomenų SLS motyvai – atitinkamai šviesiai raudonai ir mėlynai, DNR – geltonai. (B) *BpuJI* N-domeno topologinė diagrama. Spirales pavaizduotos kaip cilindrai,  $\beta$ -juostos – kaip rodyklės. Antrinės struktūros elementai nuspalvinti taip pat kaip aukščiau.

monomeras, sąveikaujantis su viena DNR molekule.

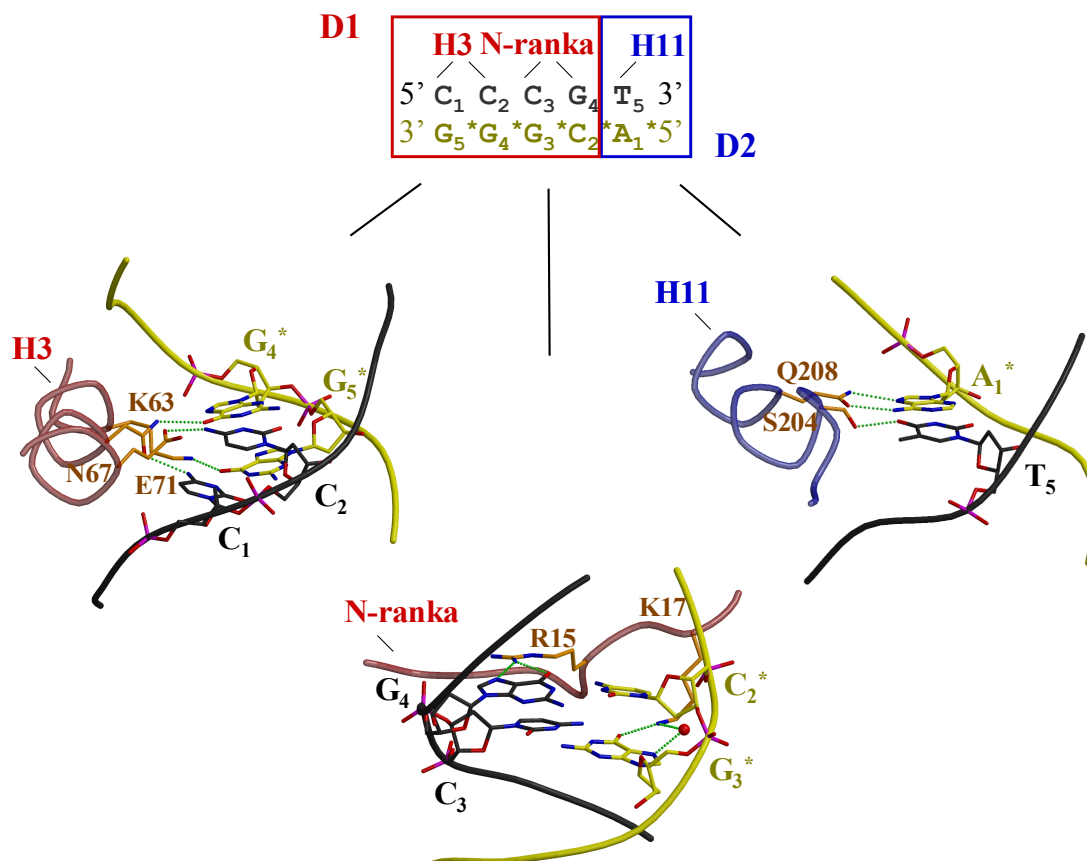
Išsprendus erdvinę struktūrą, paaiškėjo, kad *BpuJI* N-domeną (8 pav.) sudaro du mažesni subdomenai, D1 ir D2. Taip pat gali būti išskiriamas ir tarp jų esantis DL subdomenas. D1 subdomenas turi SLS motyvą (H2 ir H3 spirales), po kurio seka „sparnas“ –  $\beta$ -plaukų segtuko struktūra (angl. winged helix)<sup>49</sup>. D2 subdomeno sankloda yra panaši, tačiau stipriai modifikuota. Tarp D2 SLS motyvo spiralių (H8 ir H11) yra ne kelių aminorūgščių ilgio linkis kaip daugumoje SLS baltymų, o 35 aminorūgščių ilgio  $\alpha$ -spiralinis intarpas.

*BpuJI* D1 ir D2 subdomenai sąveikauja su DNR priešingose jos pusėse (8 pav., A). Abiejų SLS motyvų atpažinimo spirales (H3 ir H11) išsidėsto didžiajame DNR griovyje statmenai DNR spiralei ir sudaro vandenilines jungtis su taikinio bazėmis ir fosfatais. Iš

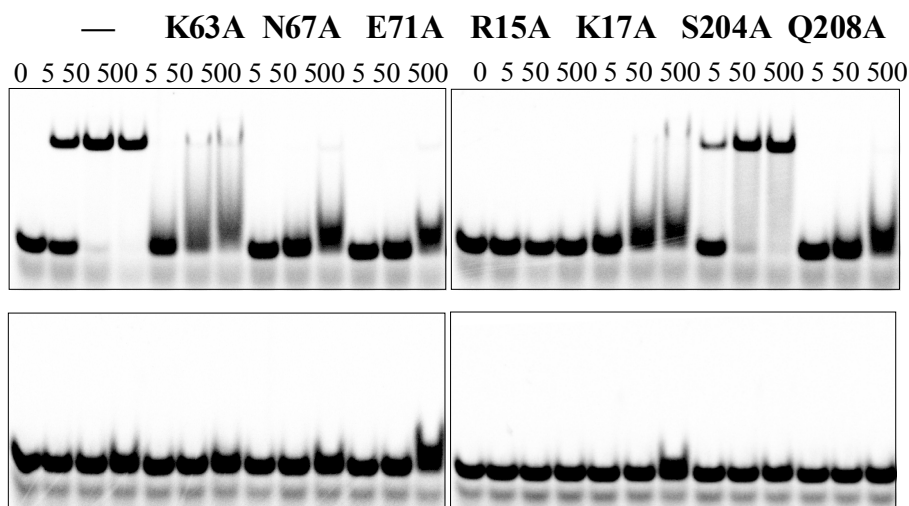
didžiojo griovio pusės taikinio bazes atpažįsta ir N-galinė ranka (1-21 a.r.). Tuo tarpu DL subdomenas priartėja prie DNR iš mažojo griovio pusės ir sąveikauja su šalia taikinio esančiomis bazėmis ir fosfatais. Sąveikaudamas su taikiniu BpuJI N-domenas ženkliai nekeičia DNR konformacijos.

### 2.2.8 BpuJI taikinio atpažinimas

Visos BpuJI taikinio 5'-CCCGT bazės tiesiogiai atpažįstamos didžiajame DNR griovyje. Aminorūgštys, kurios sąveikauja su taikinio bazėmis, priklauso SLS motyvų atpažinimo spiralėms (H3 ir H11) ir N-galinei rankai (9 pav.). Su pirmomis taikinio C-G bazių poromis (5'-CCCGT) sąveikauja D1 atpažinimo spiralės (H3) Lys63, Asn67 ir Glu71: Lys63 sudaro vandenilinę jungtį su G<sub>5</sub>\* guanino (bazių numeriai pagal 9 pav.) O6 atomu; Asn67 – su C<sub>1</sub> citozino N4 ir G<sub>4</sub>\* guanino O6 atomais; o Glu71 – su C<sub>2</sub> citozino N4 atomu. Vidinės C-G bazių poros (5'-CCCGT) atpažįstamos N-rankos Arg15 ir Lys17. Lys17 sudaro vandenilinę jungtį su G<sub>3</sub>\* guanino O6 atomu ir vandens molekule, kuri sąveikauja su to paties guanino N7 atomu, o Arg25 sudaro dvi vandenilines jungtis su G<sub>4</sub> guaninu (9 pav.). D2 subdomenas sąveikauja tik su T-A bazių pora taikinio 3'-gale. Ši bazių pora atpažįstama Gln208 ir Ser204, esančių atpažinimo spiralėje (H11) – Gln208 sudaro dvi vandenilines jungtis su adeninu, o Ser204 – su timino O4 atomu (9 pav.).



9 pav. BpuJI taikinio atpažinimas. Bazių poros, kurias atpažįsta D1 ir D2 subdomenų aminorūgštys, apibrauktos atitinkamai raudonai ir mėlynai, nurodant sąveikaujančius antrinės struktūros elementus. Detalios sąveikos schemas pateiktos žemiau. Vandenilinės jungtys pavaizduotos žaliais brūkšneliais, vandens molekulės – raudonomis sferomis.



10 pav. *BpuJI* N-domeno ir jo mutantų DNR surišimo tyrimas. 2 nM radioaktyvia žyme žymėtos specifinės 16/16(SP) (viršutiniai geliai) arba nespecifinės 16/16 (apatiniai geliai) DNR sumaišyta su 0-500 nM laukinio tipo arba mutantinio baltymo (mutacijos ir koncentracijos nurodytos virš atitinkamų takelių). Pavyzdžiai analizuoti atliekant elektroforezę poliakrilamido geliuose natyviomis sąlygomis.

Siekiant patikrinti, ar stebimi kontaktai su taikinio bazėmis yra tikrai svarbūs sąveikai su DNR, Lys63, Asn67, Glu71, Arg15, Lys17, Ser204 ir Gln208 aminorūgštys po vieną kryptingai pakeistos alaninu. Laukinio tipo N-domenas ir jo mutantai išgryninti įvedus šešių histidino liekanų „inkarą“ C-gale. Atlikus DNR surišimo tyrimą paaiškėjo, kad *BpuJI* N-domenas taikinį turinčią DNR suriša labai gerai ( $K_d=7.3\pm 0.3$  nM), o su nespecifiniu oligodupleksu beveik nesąveikauja (10 pav.). N67A, E71A, R15A bei Q208A mutantų sąveika su taikinį turinčia DNR yra praktiškai nepastebima, K63A ir K17A – ženkliai sumažėjusi ( $K_d$  lygios atitinkamai  $48\pm 7.4$  nM ir  $67\pm 14$  nM), o S204A mutacija didelės įtakos DNR surišimui neturėjo ( $K_d=9.6\pm 1.0$  nM) (10 pav.). Šie duomenys pavirtina, kad Lys63, Asn67, Glu71, Arg15, Lys17 ir Gln208 aminorūgštys yra svarbios N-domeno sąveikai su DNR.

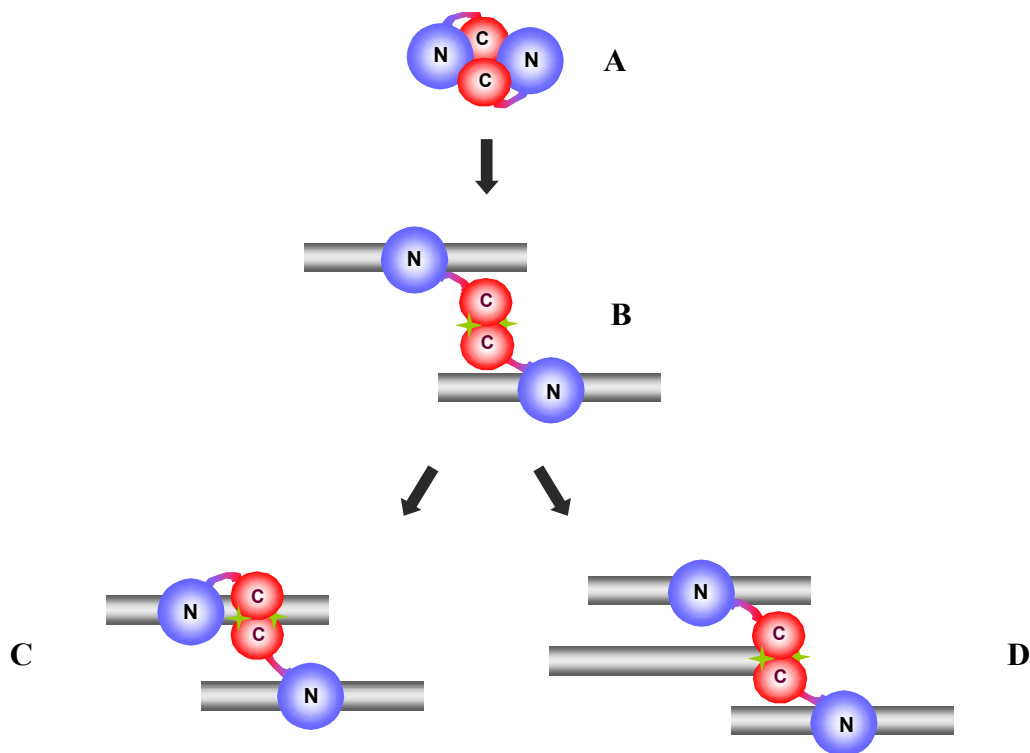
## 2.3 *BpuJI* veikimo modelis ir panašumas į kitus baltymus

### 2.3.1 *BpuJI* veikimo modelis

Čia pateikti duomenys rodo, kad *BpuJI* yra sudaryta iš dviejų atskirų domenų: N-domenas turi du SLS motyvus ir atpažįsta 5'-CCCGT taikinį, o C-domenas yra panašus į Holidėjaus jungtis kerpančias nukleazės ir turi vieną PD-(D/E)XK aktyvų centrą. Domenus jungia „jungtukas“, kuris greičiausiai yra lankstus. *BpuJI* dimerizuojasi sąveikaujant C-domenams, todėl jos dimeras turi du sąveikos su taikiniu paviršius ir gali vienu metu surišti dvi DNR molekules (11 pav., A, B). Nesant taikinio C-domeno nukleazinis aktyvumas yra nuslopintas – *BpuJI* beveik nekarpo nespecifinės DNR. N-domenui atpažinus taikinį, greičiausiai pasikeičia baltymo konformacija ir aktyvuojamas katalitinis domenas. Aktyvuotas *BpuJI* C-domenas yra nespecifinė nukleazė, linkusi nukirpti ~3 nt nuo buko dvigrandės DNR galo.

Jeigu *BpuJI* taikiny yra ilgoje DNR molekulėje, aktyvuotas katalitinis domenas gali





11 pav. BpuJI veikimo modelio schema. BpuJI yra dimerinė ir sudaryta iš dviejų domenu, N-domeno ir C-domeno (nuspalvinti atitinkamai mėlynai ir raudonai). BpuJI dimeras turi du aktyvius centrus C-domenuose (pavaizduoti kaip žalios žvaigždutės). Nesant taikinio C-domeno nukleazinis aktyvumas yra nuslopintas (A). N-domenams surišus specifinę DNR, baltymo konformacija pasikeičia (B) ir aktyvuojamas C-domenas. Aktyvuotas C-domenas kerpa DNR nepastovioje vietoje šalia taikinio (C). Be to, aktyvuotas C-domenas turi nuo 3'-galo priklausomą nukleazinį aktyvumą ir gali kirpti kitą DNR molekulę (D).

kirpti DNR atsitiktinėje vietoje šalia taikinio, priklausomai nuo „jungtuko“ tarp domenu ilgio ir/ar taikinio apsupties (11 pav., C). Susidariusi DNR gali būti toliau hidrolizuojama nuo 3'-galo. Be to, aktyvuotas C-domenas nuo 3'-galo gali kirpti ir kitą tirpale esančią DNR molekulę (11 pav., D). Todėl BpuJI DNR karpymo pobūdis yra sudėtingas ir susidaro reakcijos produktai su skirtingais galais.

### 2.3.2 BpuJI vieta restrikcijos endonukleazių klasifikacijoje

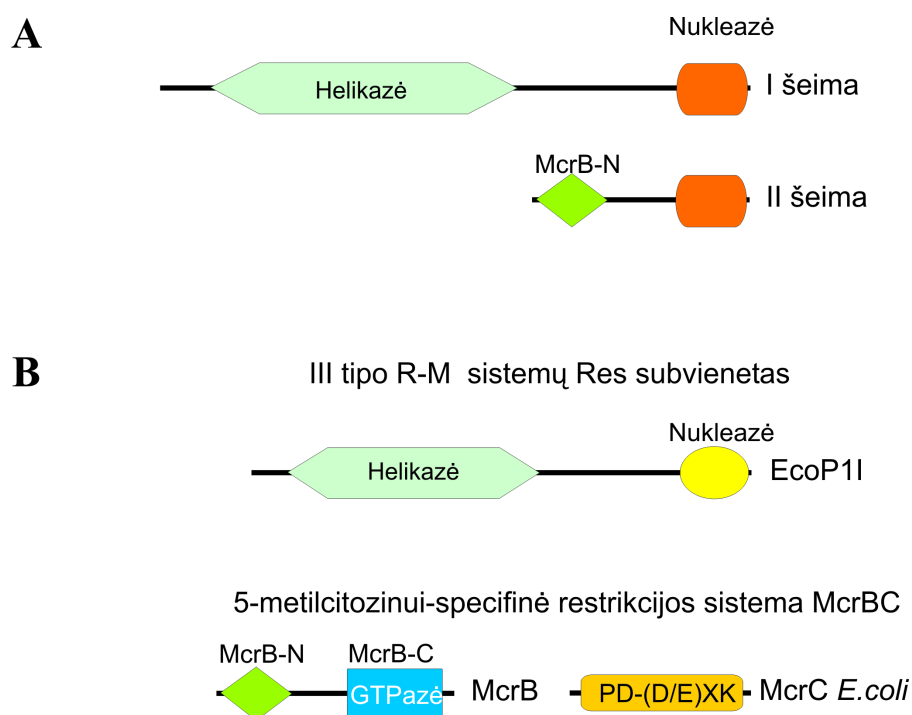
Kadangi BpuJI kerpa DNR iš abiejų taikinio pusių, ją būtų galima priskirti IIB tipo REazėms. Tačiau charakterizuoti IIB tipo fermentai atpažįsta pertrauktas sekas ir iškerpa tam tikro ilgio DNR fragmentą su taikiniu<sup>1</sup>, o BpuJI skėlimo vieta yra variabili. Be to, IIB tipo REazės yra bifunkcinės (pasižymi ir metiltransferaziniu aktyvumu), ir DNR karpymui joms dažnai reikalingi ne tik  $Mg^{2+}$  jonai, bet ir S-adenozil-L-metioninas<sup>50</sup>. Taigi, BpuJI nuo jų skiriasi ir savo genų organizacija bei kofaktorių poreikiu. BpuJI taip pat skiriasi nuo I ir III tipo fermentų, kurie DNR hidrolizuoja nepastovioje vietoje, bet yra sudaryti iš kelių subvienetų ir multifunkciniai. Šie fermentai pasižymi metiltransferaziniu aktyvumu ir naudodami ATP energiją translokuoja DNR<sup>51</sup>.

Savo asimetrine 5 nt ilgio atpažinimo seka ir genų organizacija (restrikcijos endonukleazė ir dvi metiltransferazės) BpuJI primena IIS tipo fermentus. Jos struktūrinė

organizacija taip pat yra panaši į FokI. Abu fermentai yra sudaryti iš dviejų domenų: N-domenas sąveikauja su taikiniu, o C-domenas turi aktyvų centrą. Pagrindinis struktūrinės organizacijos skirtumas yra tas, kad BpuJI tirpale yra dimeras, o FokI – monomeras, kuris dimerizuojasi tik sąveikaudamas su DNR<sup>42, 52, 53</sup>. Tačiau pagrindinis kriterijus, pagal kurį fermentas yra priskiriamas II tipui, yra tai, kad jis kerpa DNR taikinyje arba šalia jo, ir kirpimo vieta yra griežtai fiksuota arba nežymiai variabili (1-2 nt ribose)<sup>54</sup>. Todėl BpuJI dėl labai variabilios kirpimo vietos negalėtų būti priskiriama IIS tipo fermentams. Įdomu, kad dirbtinės endonukleazės, gautos suliejus FokI katalitinį domeną su zinko pirštų ar kitais DNR atpažinimo domenais, hidrolizuoja DNR šalia taikinio, bet jų kirpimo vieta yra variabili<sup>55-59</sup>.

### 2.3.3 BpuJI C-domeno panašumas į kitus baltymus

Sanklodos atpažinimo ir mutagenezės rezultatai rodo, kad BpuJI C-domenas priklauso PD-(D/E)XK superšeimai ir yra labiausiai panašus į Holidėjaus jungtis kerpančias nukleazes (2.2.4). Tačiau PSI-BLAST<sup>13</sup> metodu ieškant į BpuJI C-domeną panašių baltymų jos surastos nebuvo, o buvo surasta daug gana įvairių spėjamų baltymų. Jie turėtų būti labiau panašūs į BpuJI C-domeną nei į Holidėjaus jungtis kerpančias nukleazes. Dr. Česlovas Venclovas (Biotechnologijos institutas) išskyrė kelias į BpuJI C-domeną panašių baltymų šeimas, iš kurių įdomiausios buvo dvi.



12 pav. Į BpuJI C-domeną panašių spėjamų baltymų (A), III tipo R-M sistemų (pavyzdžiui, EcoP1I) Res subvieneto ir 5-metilcitozinui-specifinės restrikcijos endonukleazės McrBC (B) domeninė organizacija. Pirmos šeimos baltymuose į BpuJI C-domeną panašus nukleazinis domenas (oranžinis) yra sulietas su helikaziniu domenu, o antros – su į McrB N-galinį domeną panašiu domenu. EcoP1I Res subvienetas turi N-galinį helikazinį ir C-galinį nukleazinį domenus; McrB subvienetą sudaro N-galinis DNR atpažinimo (McrB-N) ir C-galinis GTP-azinis (McrB-C) domenai, o McrC subvienetas turi PD-(D/E)XK aktyvų centrą.

Pirmai grupei priklauso bakterijų ir archėjų baltymai (~900-1200 a.r.), kurie turi į BpuJI C-domeną panašius domenų ir charakteringus II superšeimos helikazių motyvus (12 pav., A). Tokia struktūra yra būdinga III tipo restrikcijos endonukleazių Res subvienetams (12 pav., B)<sup>51</sup>. Be to, šalia šios grupės baltymus koduojančių genų surasti adenino-metiltransferazę koduojantys genai. Taigi, pirmos grupės baltymai greičiausiai yra III tipo R-M sistemų Res subvienetai.

Antros grupės baltymų (~400 a.r.) N-galinės dalies aminorūgščių seka yra panaši į McrB, vieno iš 5-metilcitozinui-specifinės restrikcijos endonukleazės McrBC (12 pav., B) subvienetų, N-galinį domeną (12 pav. A). Parodyta, kad McrB N-galinis domenas yra DNR surišantis domenas, kuris atpažįsta metilintą DNR<sup>60</sup>. Todėl baltymai, kurie greičiausiai turi į BpuJI panašų nukleazinį domeną sulietą su metilintą DNR atpažįstančiu domenu, galėtų būti metilintą DNR atpažįstančios restrikcijos endonukleazės.

### 2.3.4 BpuJI N-domeno panašumas į kitus baltymus

DALI<sup>61</sup> paieška parodė, kad BpuJI N-galinis domeno struktūra yra panaši į gana daug baltymų, iš kurių didžioji dalis yra SLS motyvą turintys transkripcijos regulatoriai. Tačiau pats artimiausias BpuJI atpažinimo domeno struktūrinis homologas yra Nt.BspD6I endonukleazė, kerpanči tik vieną DNR grandinę (4 lentelė). BpuJI D1 subdomenas taip pat yra panašus ir į restrikcijos endonukleazę FokI, nors, kaip DALI paieškos taikinį naudojant viso BpuJI atpažinimo domeno struktūrą, šio panašumo rasti nepavyko.

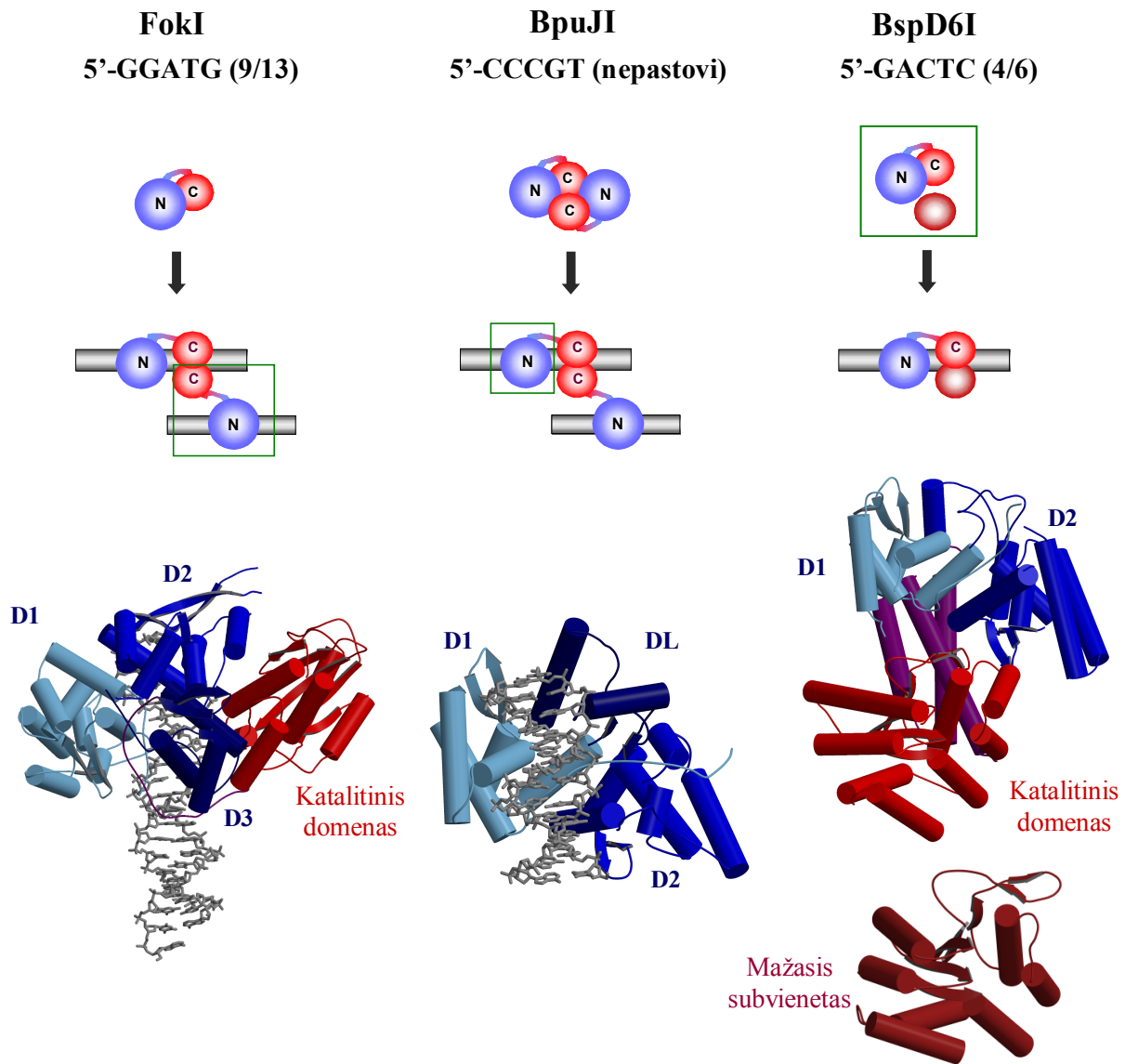
#### 4 lentelė. Į BpuJI atpažinimo domeną panašūs baltymai

Paieškos taikinytis	PDB kodas	Baltymas	z-įvertis
BpuJI-Nt	2ewf	Nt.BspD6I	13.4
(1–280 a.r.)	2qww	MarR šeimos transkripcijos reguliatorius	5.6
	2nnn	Spėjamas transkripcijos reguliatorius	5.5
	2ewf	Nt.BspD6I	6.4
BpuJI-D1 (20–131 a.r.)	2fok	FokI	5.5
	2qww	MarR šeimos transkripcijos reguliatorius	5.4
	2ewf	Nt.BspD6I	4.7
BpuJI D2-DL (91–280 a.r.)	2it0	Nuo geležies priklausomas reguliatorius	3.1
	1w5s	DNR replikacijos iniciacijos baltymas	3.0

\*Parodyta tik po tris baltymus, kuriems z-įverčiai buvo didžiausi.

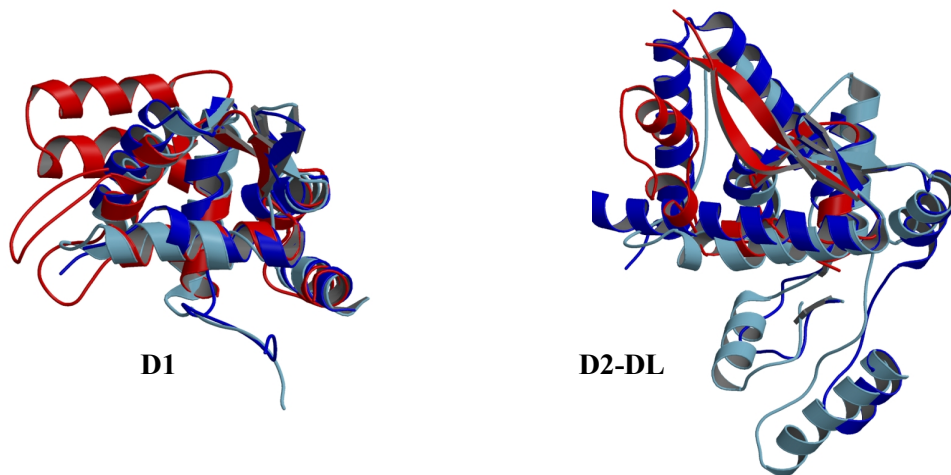
### 2.3.5 BpuJI, BspD6I ir FokI palyginimas

Endonukleazės Nt.BspD6I ir FokI, į kurias yra panašus BpuJI N-domenas (2.3.4), kaip ir BpuJI turi atskirus domenų taikinio atpažinimui ir katalizei. Visų trijų baltymų katalitiniams domenams yra būdinga PD-(D/E)XK sankloda, o N-galinius atpažinimo domenų sudaro keli SLS subdomenai (13 pav.). FokI, BpuJI ir Nt.BspD6I atpažįsta asimetrines 5 nt ilgio sekas ir kerpa DNR šalia taikinio, bet skirtingose vietose. Taip pat skiriasi ir šių baltymų oligomerinė būseną. FokI (5-GGATG (9/13)) yra monomeras tiek tirpale, tiek jos komplekso su DNR erdvinėje struktūroje<sup>6, 39</sup>. FokI monomeras turi tik vieną aktyvų centrą, tačiau ji dimerizuojasi sąveikaudama su taikinį turinčią DNR ir taip



13 pav. FokI, BpuJI ir BspD6I struktūrinė organizacija. Atpažinimo ir nukleaziniai domenai nuspalvinti atitinkamai mėlynai ir raudonai, DNR - pilkai; domenai, kurių erdvinės yra išspręstos, schemose apibraukti žaliai. Fermentų atpažinimo sekos ir skėlimo vietos nurodytos viršuje. FokI tirpale yra monomerinė<sup>39</sup>, bet dimerizuojasi sąveikaudama su taikiniu<sup>42</sup>; BpuJI tirpale yra dimerinė ir gali surišti dvi taikinio kopijas. BspD6I yra sudaryta iš dviejų subvienetų: didysis subvienetas kerpa tik vieną DNR grandinę. Tam, kad susidarytų dvigrandis trūkis, reikalingas ir mažasis subvienetas, turintis aktyvų centrą<sup>64</sup>. FokI/DNR komplekso (PDB:1fok)<sup>6</sup>, BpuJI atpažinimo domeno/DNR komplekso ir BspD6I didžiojo (pdb:2ewf)<sup>63</sup> bei mažojo (pdb:2p14)<sup>63</sup> subvienetų erdvinės struktūros parodytos žemiau. Domenai nuspalvinti taip pat kaip ir schemose.

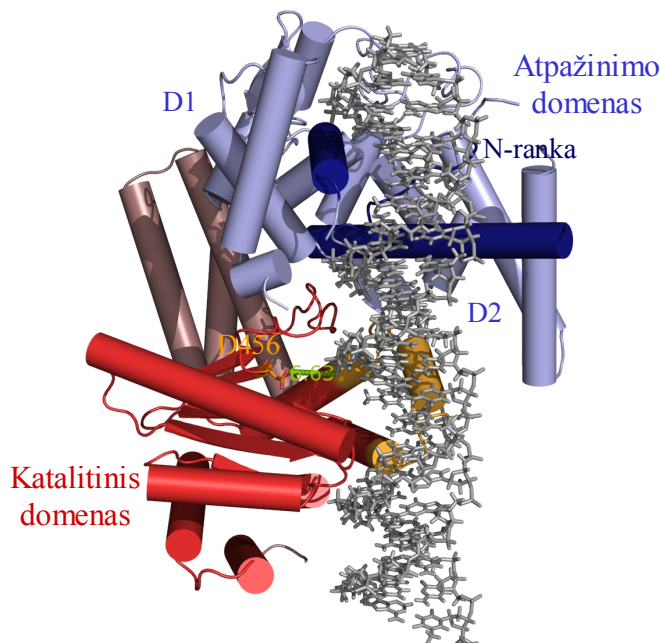
gali kirpti abi DNR grandines<sup>42</sup>. BpuJI, skirtingai nei FokI, tirpale yra dimeras ir todėl gali sąveikauti su dviem taikinio kopijomis tuo pačiu metu. Tuo tarpu Nt.BspD6I, kuri atpažįsta 5-GAGTC seką ir kerpa vieną DNR grandinę 4 nt atstumu nuo taikinio, iš tikrųjų yra vienas heterodimerinės restrikcijos endonukleazės Nt.BspD6I (5'-GACTC (4/6)) subvienetas. Antras, mažesnis, BspD6I subvienetas, kuris kerpa antrą



14 pav. TOP3D<sup>62</sup> programa viena ant kitos uždėtos BpuJI (šviesiai mėlyna), Nt.BspD6I (PDB:2ewf)<sup>63</sup> (mėlyna) and FokI (PDB:1fok)<sup>6</sup> (raudona) subdomenų erdvinės struktūros.

DNR grandinę, yra panašus į Nt.BspD6I katalitinį domeną<sup>64</sup>.

Nt.BspD6I<sup>63</sup>, kaip ir BpuJI, atpažinimo domeną sudaro du “sparnuotą” SLS motyvą (angl. winged helix) turintys subdomenai (D1 ir D2), tuo tarpu FokI<sup>6</sup> juos turi tris (D1, D2 ir D3). Beveik visi šių baltymų D1 subdomenų struktūriniai elementai sutampa uždedant struktūras viena ant kitos (14 pav.). Pagrindinis skirtumas yra tas, kad BpuJI ir Nt.BspD6I D1 yra kompaktiškesni nei FokI D1, kuris turi daugiau įsiterpusių papildomų struktūrinių elementų. D2 subdomenai yra stipriai modifikuoti, su dideliais tarpais tarp SLS motyvų  $\alpha$ -spiralių. BpuJI ir BspD6I D2 subdomenų beveik visi struktūriniai



15 pav. Nt.BspD6I/DNR komplekso modelis. Atpažinimo domenas nuspalvintas mėlynai, katalitinis domenas – raudonai, DNR – pilkai. Spėjami DNR atpažįstantys elementai (N-ranka ir SLS motyvų atpažinimo spiralės) paryškinti tamsiai mėlynai, katalitinio domeno dalis, kuri modelyje susiduria su DNR, – oranžine spalva; parodyta katalizei svarbaus Asp56 šoninė grandinė.

elementai sutampa uždedant struktūras viena ant kitos (14 pav.), tačiau tik jų pagrindinės  $\alpha$ -spirālės ir “sparnai” sutampa uždedant struktūras ant FokI D2. Toks panašumas tarp BpuJI ir FokI D2 subdomenų nėra didelis ir greičiausiai todėl nėra randamas naudojant kaip DALI paieškos taikinį C-galinę BpuJI atpažinimo domeno dalį (4 lentelė). Taigi, BpuJI ir Nt.BspD6I atpažinimo domenai yra labiau panašūs vienas į kitą nei į FokI atpažinimo domeną.

Palyginus BpuJI atpažinimo domeno ir FokI kompleksų su DNR struktūras, paaiškėjo, kad abu fermentai su taikiniaus sąveikauja D1 ir D2 subdomenais. FokI D3 subdomenas, kurio analogo BpuJI neturi, yra labiau reikalingas baltymo-baltymo nei baltymo-DNR sąveikai<sup>6</sup>. Nors BpuJI ir FokI subdomenai yra panašūs, jų orientacija baltymo-DNR kompleksuose gana stipriai skiriasi (13 pav.). BpuJI subvienetai išsidėsto taip, kad abiejų SLS motyvų atpažinimo spirālės būtų statmenos DNR spiralei, o FokI-DNR komplekse tik D1 atpažinimo spirālė yra statmena DNR spiralei<sup>6</sup>. Be to, BpuJI D1 subdomenas atpažįsta DNR bazes, esančias taikinio 5'-gale (5'-CCCCGT) o D2 – 3'-gale (5'-CCCGT). Tuo tarpu FokI D1 atpažįsta taikinio 3'-dalį (5'-GGATG), o D2 subdomenas – 5'-dalį (5'-GGATG)<sup>6</sup>.

### 2.3.6 Nt.BspD6I/DNR komplekso modelis

Nt.BspD6I erdvinė struktūra buvo išspręsta be DNR<sup>63</sup>, todėl nėra aišku, kaip BspD6I atpažįsta taikinį. Panaudojant į ją panašaus BpuJI N-domeno/DNR komplekso struktūrą būtų galima gauti Nt.BspD6I/DNR komplekso modelį. Šiam tikslui sugeneruota B-DNR, turinti 5-GAGTC seką. Ji uždėta ant BpuJI N-domeno/DNR komplekse esančios DNR taip, kad 5 nt ilgio atpažinimo sekos būtų toje pačioje vietoje, o po to uždėtos baltymų struktūros.

Gautame modelyje Nt.BspD6I atpažinimo domenas sąveikauja su DNR be erdviųjų trukdžių, o N-ranka ir SLS motyvų atpažinimo spirālės išsidėsto didžiajame DNR griovyje (15 pav.). Tai rodytų, kad, kaip ir BpuJI atveju, šie elementai atpažįsta taikinio bazes. Kerpamas fosfatas (4 nt už atpažinimo sekos) yra netoli nuo BspD6I aktyvaus centro – atstumas nuo katalizei būtino Asp456<sup>65</sup> iki fosforo atomo yra mažesnis nei 7 Å. Tačiau šis atstumas yra didesnis nei turėtų būti aktyvios nukleazės/DNR komplekse. Be to, dalis Nt.BspD6I katalitinio domeno (394-415 a.r.) susiduria su DNR (15 pav.). Tai rodytų, kad Nt.BspD6I sąveikaudama su specifine DNR arba lenkia DNR, arba keičia katalitinio domeno orientaciją atpažinimo domeno atžvilgiu.

## Išvados

1. Restrikcijos endonukleazė BpuJI yra dimeras, o kiekvieną jos monomerą sudaro du domenai: N-domenas, kuris atpažįsta taikinį kaip monomeras, ir C-domenas, kuris pasižymi nukleaziniu aktyvumu ir dimerizuojasi.
2. BpuJI katalitinis C-domenas turi nuo 3'-galo priklausomą nukleazinį aktyvumą, kuris pasireiškia nukerpant ~3 nt nuo buko dvigrandės DNR galo, ir tai lemia variabilų BpuJI DNR karpymo pobūdį.
3. Bioinformatinė analizė ir kryptinga mutagenezė parodė, kad BpuJI katalitinis C-domenas turi PD-(D/E)XK struktūrinę sanklodą ir yra panašus į archėjų Holidėjaus jungtis karpančias nukleazes.
4. BpuJI N-domeno-DNR komplekso erdvinė struktūra parodė, kad šį domeną sudaro du „sparnuotą“ SLS motyvą turintys subdomenai, o BpuJI taikinį atpažįsta aminorūgštys, esančios N-rankoje ir SLS motyvų atpažinimo spiralėse.
5. BpuJI atpažinimo domenai yra panašūs į Nt.BspD6I nukleazę, kerpančią vieną DNR grandinę. Nt.BspD6I/DNR komplekso struktūros modelis rodo, kad Nt.BspD6I ir BpuJI taikinį atpažįstantys struktūriniai elementai yra panašūs.

## Padėka

Čia pristatytas darbas buvo atliktas Biotechnologijos institute. Už finansinę paramą esu dėkinga BIOCEL, Makso Planko draugijai ir Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui.

Esu labai dėkinga darbo vadovui prof. Virginijui Šikšniui už vertingus pasiūlymus, diskusijas ir pagalbą rengiant disertaciją. Dėkoju dr. Sauliui Gražuliui už kristalografijos pamokas, skriptus ir pagalbą sprendžiant struktūrą. Dėkoju dr. Arūnui Lagunavičiui už vadovavimą magistriniam darbui ir išmokymą dirbti laboratorijoje.

Dėkoju visiems kolegoms iš Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimo laboratorijos, ypač dr. Giedrei Tamulaitienei, dr. Gintautui Tamulaičiui, dr. Mindaugui Zarembai ir dr. Giedriui Sasnauskui, už patarimus ir diskusijas. Dėkoju prof. Gervydui Dieniui už paskatinimą pradėti doktorantūros studijas ir nuolatinį palaikymą.

Esu labai dėkinga dr. Kornelijui Stankevičiui, kuris klonavo BpuJI R-M sistemą, dr. Česlovui Venclovui už bioinformatinę analizę ir prof. Claus Urbanke (Hannover Medizinische Hochschule) už analitinį centrifugavimą. Dėkoju UAB „Fermentas“ už BpuJI R-M sistemos kloną ir suteiktą galimybę naudotis kai kuria įranga.

Taip pat norėčiau padėkoti dr. Donatui Vaitkevičiui ir dr. Zitai Manelienei (UAB „Fermentas“) už pradinį BpuJI charakterizavimą, dr. Will Mawby (University of Bristol) už N-galinių aminorūgščių nustatymą, dr. Mattias Bochtler (International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw) už kristalų patikrinimą, dr. Manfred Weiss (EMBL Hamburg) už pagalbą surenkant duomenis X12 spindulių linijoje ir dr. Gražvydui Lukinavičiui už masių spektrometriją.

Dėkoju savo šeimai ir draugams už rūpestį ir palaikymą.



## Publikacijų sąrašas

Disertacijoje pateikta medžiaga yra paskelbta šiuose straipsniuose:

1. Sukackaite, R., Lagunavicius, A., Stankevicius, K., Urbanke, C., Venclovas, C. and Siksnyis, V. (2007) Restriction endonuclease BpuJI specific for the 5'-CCCGT sequence is related to the archaeal Holliday junction resolvase family. *Nucleic Acids Res*, 35, 2377-2389.
2. Sukackaite R., Grazulis S., Bochtler, M., Siksnyis, V. (2008) The recognition domain of the BpuJI restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.3 Å resolution. *J. Mol. Biol*, 378, 1084–1093.

## **Duomenys apie autorių**

Rasa Sukackaitė gimė 1980 m. rugpjūčio 14 d. Vilniuje.

1998-2004 m. studijavo Vilniaus universitete Chemijos fakultete biochemijos specialybę. Nuo 2000 m. pradėjo dirbti Biotechnologijos institute, Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimo laboratorijoje. Čia vadovaujama dr. A. Lagunavičiaus parengė baigiamąjį darbą „Restrikcijos endonukleazės BpuII savybių tyrimas“, kurį apgynė 2004 metais. 2004-2008 m. Biotechnologijos institute R. Sukackaitė studijavo biochemijos (04 P) krypties baltymų ir enzimologijos (P310) šakos doktorantūroje (vadovas prof. dr. V. Šikšnys). Studijų tema – „Restrikcijos endonukleazės BpuII struktūriniai ir funkciniai tyrimai“. Nuo 2008 m. dirba Biotechnologijos institute jaunesniąja mokslo darbuotoja.

Pagrindinės R. Sukackaitės mokslinių interesų kryptys – baltymų-DNR sąveikos mechanizmai, baltymų kristalografija bei restrikcijos endonukleazių struktūros ir funkcijos ryšys.

## Summary

Type IIS restriction endonucleases recognize asymmetric DNA sequences and cleave both DNA strands at fixed positions downstream of the recognition site. Restriction endonuclease BpuJI recognizes the asymmetric sequence 5'-CCCGT, but it cuts at multiple sites in the vicinity of the target sequence. This study shows that BpuJI is a dimer in solution and consists of two separate domains. The N-terminal domain binds to the target sequence as a monomer, while the C-terminal domain is responsible for nuclease activity and dimerization. The BpuJI dimer has two DNA binding surfaces provided by the N-terminal domains and displays optimal catalytic activity when bound to two copies of the recognition site. The isolated BpuJI catalytic domain possesses an end-directed nuclease activity and preferentially cuts ~3 nt from the 3'-terminus of blunt-ended DNA. The nuclease activity of the C-domain is repressed in the apo-enzyme and becomes activated upon specific DNA binding by the recognition domains. The activated catalytic domain can cleave DNA at variable position near the target site. A linear DNA resulting from BpuJI cleavage at the recognition site may be further subjected to the 3'-end directed endonucleolytic cleavage by the activated C-domain. This leads to a complicated pattern of specific DNA cleavage in the vicinity of the target site. In addition, another DNA molecule (even lacking the BpuJI target site) present in the solution can also be subjected to the end-directed nuclease activity of the activated C-terminal domain.

Bioinformatics and mutational analysis revealed that the BpuJI catalytic domain harbours a PD-(D/E)XK active site and is structurally related to archaeal Holliday junction resolvases. Bioinformatics analysis identified a domain similar to the BpuJI C-domain in functionally uncharacterized proteins that could be Res subunits of Type III enzymes and methyl-directed restriction endonucleases. The crystal structure of the BpuJI recognition domain bound to cognate DNA was solved at 1.3 Å resolution. It revealed two winged-helix subdomains, D1 and D2. The recognition of the 5'-CCCGT target sequence is achieved by BpuJI through the major groove contacts of the amino acid residues located on both the HTH motifs and an N-terminal arm. The role of these interactions in the DNA recognition is also corroborated by mutational analysis. The BpuJI DNA recognition domain is most similar to Nt.BspD6I, a large subunit of the heterodimeric restriction endonuclease. The modelling suggests that Nt.BspD6I, which crystal structure was solved without DNA, could share the specificity-determining regions with BpuJI. The recognition domains of BpuJI and Nt.BspD6I also share some structural similarity with the archetypal Type IIS enzyme FokI. However, the orientation of the D1 and D2 subdomains in the BpuJI and FokI protein-DNA complexes is different.

## Literatūros sąrašas

- 1 Roberts R.J., Vincze T., Posfai J. and Macelis D. (2007) REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res* **35**, p. D269-70.
- 2 Pingoud A. and Jeltsch A. (2001) Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* **29**, 3705-3727.
- 3 Pingoud A., Fuxreiter M., Pingoud V. and Wende W. (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**, 685-707.
- 4 Anderson J. (1993) Restriction endonucleases and modification methylases *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 24-30.
- 5 Li L., Wu L.P. and Chandrasegaran S. (1992) Functional domains in Fok I restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4275-4279.
- 6 Wah D.A., Hirsch J.A., Dorner L.F., Schildkraut I. and Aggarwal A.K. (1997) Structure of the multimodular endonuclease FokI bound to DNA. *Nature* **388**, 97-100.
- 7 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.
- 8 Grazulis S., Manakova E., Roessle M., Bochtler M., Tamulaitiene G., Huber R. and Siksnys V. (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.
- 9 Sasnauskas G., Halford S.E. and Siksnys V. (2003) How the BfiI restriction enzyme uses one active site to cut two DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6410-6415.
- 10 Cesnaviciene E., Petrusyte M., Kazlauskienė R., Maneliene Z., Timinskas A., Lubys A. and Janulaitis A. (2001) Characterization of AtoI, a restriction-modification system of a new type. *J Mol Biol* **314**, 205-216.
- 11 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Sfruchl, K.. *Shorts protocols in molecular biology, A compedium of methods from current protocols in molecular biology*, 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc, Canada, 1995.
- 12 Söding J., Biegert A. and Lupas A.N. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Res* **33**, p. W244-8.
- 13 Li W., Pio F., Pawłowski K. and Godzik A. (2000) Saturated BLAST: an automated multiple intermediate sequence search used to detect distant homology. *Bioinformatics* **16**, 1105-1110.
- 14 Pei J., Sadreyev R. and Grishin N.V. (2003) PCMA: fast and accurate multiple sequence alignment based on profile consistency. *Bioinformatics* **19**, 427-428.
- 15 Do C.B., Mahabhashyam M.S.P., Brudno M. and Batzoglou S. (2005) ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment. *Genome Res* **15**, 330-340.
- 16 Ducruix A. and Giege R.. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A practical approach.* Oxford University Press, New York, 1992.
- 17 Leslie A.G.W. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 48-57.
- 18 Evans P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 72-82.
- 19 French, G.S. & Wilson, K.S. (1978) On the treatment of negative intensity observations *Acta Crystallogr.* **A34**, 517-525.
- 20 Collaborative Computational Project Number 4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography *Acta Crystallogr.* **D50**, 760-763.
- 21 Cowtan K. (1994) Dm: An automated procedure for phase improvement by density modification *Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography* **31**, 34-38.
- 22 Morris, R.J., Perrakis, A. & Lamzin, V.S. (2002) Arp/warp's model-building algorithms. I. the main chain *Acta Crystallogr.* **D58**, 968-975.
- 23 Emsley P. and Cowtan K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**, 2126-2132.

- 24 Brünger 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.
- 25 Murshudov G.N., Vagin A.A. and Dodson E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **53**, 240-255.
- 26 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.
- 27 Vriend G. (1990) WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**, p. 52-6, 29.
- 28 Sambrook J., Fritsch E. and Maniatis T.. Molecular Cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 29 Barik S. (1995) Site-directed mutagenesis by double polymerase chain reaction. *Mol Biotechnol* **3**, 1-7.
- 30 Zheng L., Baumann U. and Reymond J. (2004) An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* **32**, p. e115.
- 31 Yoshioka K. (2002) KyPlot – a user-oriented tool for statistical data analysis and visualization. *CompStat* **17**, 425-437.
- 32 Siksnyš V., Skirgaila R., Sasnauskas G., Urbanke C., Cherny D., Grazulis S. and Huber R. (1999) The Cfr10I restriction enzyme is functional as a tetramer. *J Mol Biol* **291**, 1105-1118.
- 33 Soundararajan M., Chang Z., Morgan R.D., Heslop P. and Connolly B.A. (2002) DNA binding and recognition by the IIs restriction endonuclease MboII. *J Biol Chem* **277**, 887-895.
- 34 Bath A.J., Milsom S.E., Gormley N.A. and Halford S.E. (2002) Many type IIs restriction endonucleases interact with two recognition sites before cleaving DNA. *J Biol Chem* **277**, 4024-4033.
- 35 Lagunavicius A., Sasnauskas G., Halford S.E. and Siksnyš 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.
- 36 Oller A.R., Vanden Broek W., Conrad M. and Topal M.D. (1991) Ability of DNA and spermidine to affect the activity of restriction endonucleases from several bacterial species. *Biochemistry* **30**, 2543-2549.
- 37 Wentzell L.M., Nobbs T.J. and Halford S.E. (1995) The SfiI restriction endonuclease makes a four-strand DNA break at two copies of its recognition sequence. *J Mol Biol* **248**, 581-595.
- 38 Embleton M.L., Williams S.A., Watson M.A. and Halford S.E. (1999) Specificity from the synapsis of DNA elements by the Sfi I endonuclease. *J Mol Biol* **289**, 785-797.
- 39 Kaczorowski T., Skowron P. and Podhajska A.J. (1989) Purification and characterization of the FokI restriction endonuclease. *Gene* **80**, 209-216.
- 40 Sektas M., Kaczorowski T. and Podhajska A.J. (1992) Purification and properties of the MboII, a class-IIS restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res* **20**, 433-438.
- 41 Tucholski J., Skowron P.M. and Podhajska A.J. (1995) MmeI, a class-IIS restriction endonuclease: purification and characterization. *Gene* **157**, 87-92.
- 42 Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K. and Schildkraut I. (1998) FokI dimerization is required for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10570-10575.
- 43 Nishino T., Komori K., Tsuchiya D., Ishino Y. and Morikawa K. (2001) Crystal structure of the archaeal holliday junction resolvase Hjc and implications for DNA recognition. *Structure* **9**, 197-204.
- 44 Bond C.S., Kvaratskhelia M., Richard D., White M.F. and Hunter W.N. (2001) Structure of Hjc, a Holliday junction resolvase, from *Sulfolobus solfataricus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5509-5514.
- 45 Middleton C.L., Parker J.L., Richard D.J., White M.F. and Bond C.S. (2004) Substrate recognition and catalysis by the Holliday junction resolving enzyme Hje. *Nucleic Acids Res* **32**, 5442-5451.
- 46 Aravind L., Makarova K.S. and Koonin E.V. (2000) SURVEY AND SUMMARY: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families, phyletic distribution and evolutionary trajectories. *Nucleic Acids Res* **28**, 3417-3432.
- 47 Lilley D.M. and White M.F. (2001) The junction-resolving enzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 433-443.
- 48 Tamulaitiene G., Jakubauskas A., Urbanke C., Huber R., Grazulis S. and Siksnyš V. (2006) The

crystal structure of the rare-cutting restriction enzyme SdaI reveals unexpected domain architecture. *Structure* **14**, 1389-1400.

49 Aravind L., Anantharaman V., Balaji S., Babu M.M. and Iyer L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 231-262.

50 Marshall J.J.T., Gowers D.M. and Halford S.E. (2007) Restriction endonucleases that bridge and excise two recognition sites from DNA. *J Mol Biol* **367**, 419-431.

51 Dryden D.T., Murray N.E. and Rao D.N. (2001) Nucleoside triphosphate-dependent restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* **29**, 3728-3741.

52 Catto L.E., Ganguly S., Milsom S.E., Welsh A.J. and Halford S.E. (2006) Protein assembly and DNA looping by the FokI restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res* **34**, 1711-1720.

53 Catto L.E., Bellamy S.R.W., Retter S.E. and Halford S.E. (2008) Dynamics and consequences of DNA looping by the FokI restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res* **36**, 2073-2081.

54 Roberts R.J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A.S., Bickle T.A., Bitinaite J., Blumenthal R.M., Degtyarev S.K., Dryden D.T.F., Dybvig K., Firman K., Gromova E.S., Gumpport R.I., Halford S.E., Hattman S., Heitman J., Hornby D.P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T.R., Kobayashi I., Kong H., Krüger D.H., Lacks S., Marinus M.G., Miyahara M., Morgan R.D., Murray N.E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D.N., Reich N., Repin V.E., Selker E.U., Shaw P., Stein D.C., Stoddard B.L., Szybalski W., Trautner T.A., Van Etten J.L., Vitor J.M.B., Wilson G.G. and Xu S. (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* **31**, 1805-1812.

55 Kim Y.G. and Chandrasegaran S. (1994) Chimeric restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 883-887.

56 Kim Y.G., Cha J. and Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1156-1160.

57 Kim Y.G., Smith J., Durgesha M. and Chandrasegaran S. (1998) Chimeric restriction enzyme: Gal4 fusion to FokI cleavage domain. *Biol Chem* **379**, 489-495.

58 Smith J., Bibikova M., Whitby F.G., Reddy A.R., Chandrasegaran S. and Carroll D. (2000) Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Res* **28**, 3361-3369.

59 Minczuk M., Papworth M.A., Miller J.C., Murphy M.P. and Klug A. (2008) Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **36**, 3926-3938.

60 Pieper U., Schweitzer T., Groll D.H. and Pingoud A. (1999) Defining the location and function of domains of McrB by deletion mutagenesis. *Biol Chem* **380**, 1225-1230.

61 Holm L. and Sander C. (1996) Alignment of three-dimensional protein structures: network server for database searching. *Methods Enzymol* **266**, 653-662.

62 Lu G. (2000) TOP: a new method for protein structure comparisons and similarity searches. *J. Appl. Crystallogr.* **33**, p. 176-183.

63 Kachalova G.S., Rogulin E.A., Yunusova A.K., Artyukh R.I., Perevyazova T.A., Matvienko N.I., Zheleznaya L.A. and Bartunik H.D. (2008) Structural analysis of the heterodimeric type IIS restriction endonuclease R.BspD6I acting as a complex between a monomeric site-specific nickase and a catalytic subunit. *J Mol Biol* **384**, 489-502.

64 Yunusova A.K., Rogulin E.A., Artyukh R.I., Zheleznaya L.A. and Matvienko N.I. (2006) Nickase and a protein encoded by an open reading frame downstream from the nickase BspD6I gene form a restriction endonuclease complex. *Biochemistry (Mosc)* **71**, 815-820.

65 Higgins L.S., Besnier C. and Kong H. (2001) The nicking endonuclease N.BstNBI is closely related to type IIS restriction endonucleases MlyI and PleI. *Nucleic Acids Res* **29**, 2492-2501.