

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gediminas Alzbutas

**PROKARIOTINIŲ DNAZĖS I HOMOLOGŲ
PAKANTUMO DRUSKINGUMUI /
HALOFILIŠKUMO MECHANIZMAI BEI JAUČIO
DNAZĖS I ATSPARUMO JONINEI JĖGAI
DIDINIMAS**

Daktaro disertacija

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2016

Disertacija rengta 2011–2015 m. studijuojant doktorantūroje Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute bei UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ ir ginama eksternu.

Mokslinis konsultantas:

dr. Arūnas Lagunavičius (UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Padėka

Dėkoju prof. habil. dr. Arvydui Janulaičiui už paskatinimą tirti DNazės I homologus halofiliniuose organizmuose. Dėkoju vadovui dr. Arūnui Lagunavičiui už paskatinimą, konstruktyvią kritiką ir patarimus. Dėkoju UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ už suteiktą galimybę atlikti tyrimus ir derinti darbą bei studijas bei MTEPC padalinio darbuotojams už nuoširdžią pagalbą bei patarimus. Esu labai dėkingas savo šeimai, ypač Jurgai, už kantrybę, supratimą ir palaikymą.

Gediminas

Vilnius, 2016

Turinys

Santrumpos	1
Įvadas	3
Literatūros apžvalga	8
1.1. Bendrosios DNazės I savybės	8
1.2. Katalizės mechanizmas	8
1.3. Sąveika su DNR	10
1.3.1. Kontaktai su DNR	10
1.3.2. Sąsaja tarp sąveikos su DNR ir aktyviojo centro	11
1.3.3. DNR lankstumo svarba	11
1.3.4. Metalų jonų svarba	12
1.3.5. Bandymai taškinėmis mutacijomis padidinti sąveiką su DNR	15
1.4. Bakterinės sekretuojamos nukleazės	15
1.4.1. Galimos bakterinių sekretuojamų nukleazių funkcijos	16
1.4.2. Halofilinės / druskingumui pakančios nukleazės	17
1.5. Halofilinių / druskingumui pakančių fermentų savybės	17
1.6. HhH motyvas	20
1.6.1. HhH motyvas ir ComEA baltymas	20
1.6.2. Dvigubo HhH motyvo domeno panaudojimas baltymų inžinerijoje	21
1.7. DNR rišančių baltymų sąveikos su DNR analizė molekulinio modeliavimo metodais	22
1.7.1. Laisvosios energijos dedamosios	22
1.7.2. Polinės solvatacijos ir joninės jėgos ryšys	25
Medžiagos ir metodai	27
2.1. Prietaisai	27
2.2. Medžiagos	27
2.2.1. Reagentai	27
2.2.2. Buferiniai tirpalai	28
2.2.3. Bakteriniai kamienai	32
2.3. Metodai	33
2.3.1. Bakterinių į DNazę I panašių prokariotinių baltymų sekų analizė ir sąsaja su prokariotų pakantumu druskingumui	33
2.3.2. Rekombinantinių baltymų producentų gavimas	34
2.3.3. Baltymų raiška ir gryninimas	38
2.3.4. DNazinio aktyvumo vertinimas	39

2.3.5. DNazės TA DNazinio domeno struktūros modeliavimas ir analizė	42
2.3.6. DNazės TA DNR rišančio domeno filogenezė	43
2.3.7. DNR rišančių domenų molekulinis modeliavimas	44
2.3.8. Naudoti standartiniai eksperimentiniai metodai	46
Rezultatai ir jų aptarimas	50
3.1. Hipotezės bei tikslų formulavimas	50
3.2. Halofilinių / druskingumui pakančių mikroorganizmų, turinčių DNazės I šeimos baltymus, duomenų bazės kūrimas	50
3.2.1. DNazės I homologų rinkinys	51
3.2.2. Prokariotų tolerancijos druskingumui duomenys	51
3.3. DNazės I homologų filogenetinė bei domeninės struktūros analizė .	58
3.4. Sekretijos signalo paieška DNazių iš labiausiai halofilinių / druskingumui pakančių mikroorganizmų sekose	59
3.5. Domeninės organizacijos bei atsparumo druskingumui sąryšis . .	61
3.6. DNazės TA mutantai ir jų gryninimas	64
3.7. DNazės TA katalizuojama DNR hidrolizė bei kofaktorių poreikis .	65
3.8. DNazės TA bei jos mutantų atsparumas joninei jėgai, rezultatai .	67
3.9. DNazės TA bei jos mutantų atsparumas joninei jėgai, aptarimas .	70
3.10. DNazės TA struktūrinio modelio analizė	71
3.10.1. DNazės TA paviršiaus elektrostatinio potencialo sąsaja su optimaliomis kofaktorių koncentracijomis	71
3.10.2. DNR rišantis domenas – dviejų evoliucinių spaudimų pasėkmė	73
3.11. Jaučio DNazės I racionalus dizainas	76
3.11.1. DNazės TA C-galinio domeno homologų analizė	76
3.11.2. DNazės I liejinių sekų parinkimas	79
3.11.3. DNazės I liejinių gryninimas	82
3.11.4. DNazės liejinių atsparumo joninei jėgai vertinimas	82
3.12. Domenų, kurie naudoti kuriant DNazės I liejinius, struktūros modeliavimas ir analizė	87
3.12.1. Struktūrų modeliavimas	87
3.12.2. Sąveika su DNR	92
3.12.3. Elektrostatinės sąveikos modeliavimas	95
3.13. Galimos ateities tyrimų kryptys	103
Išvados	104
Publikacijų sąrašas	106
Literatūra	108

Santrumpos

APS	Amonio persulfatas.
BCIP/NBT	5-brom-4-chlor-3-indolilfosfatas / tetrazolio nitro mėlynasis.
BMR	Branduolių magnetinis rezonansas.
BS	DNR rišantis domenas iš <i>Bacillus subtilis</i> ComEA.
BSA	Jaučio serumo albuminas.
CDD	Konservatyvių domenų duombazė.
ComEA	Bakterijų kompetencijos sistemos baltymas, kurio N-galinė dalis yra hidrofobiškas „inkaras“ plazminėje membranoje, o C-galinis domenas yra giminingas DNR ir yra sudarytas iš dviejų HhH motyvų.
DNazė TA	DNazės I homologas iš <i>Thioalkalivibrio sp.</i> <i>K90mix</i> , turintis DNR rišantį domeną greta nukleazinio.
DNazė TA ΔC	DNazės TA mutantas su pašalintu C-galiniu domenu.
DNazė TA H134A	DNazės TA aktyviojo centro mutantas.
DNazė BS	DNazės I liejinys su DNR rišančiu domenu iš <i>Bacillus subtilis</i> ComEA baltymo.
DNazė DT	DNazės I liejinys su DNR rišančiu domenu iš <i>Thioalkalivibrio sp. K90mix</i> DNazės (DNazės TA).
DNazė I	jaučio deoksiribonukleazė I.

DT	DNR rišantis domenas iš DNazės TA.
EDTA	Etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska.
HhH	Baltymo motyvas spiralė - plaukų segtukas - spiralė (angl. <i>helix-hairpin-helix</i>).
H3TH	Baltymo motyvas artima HhH motyvui, bet turintis du papildomus linkių fragmentus.
(HhH) ₂	dvigubo HhH motyvo domenas.
IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozidas.
MT	Maksimali tikimybė.
PBS	Fosfatinis buferis (angl. <i>phosphate buffered saline</i>).
PGR	Polimerazės grandininė reakcija.
PMM	Paslėptasis Markovo modelis (angl. <i>hidden Markov model</i>).
RMSD	Atomo koordinacijų standartinis nuokrypis (angl. <i>root mean square deviation</i>).
SDS-PAGE	Natrio dodecilsulfato denatūruojanti poliakrilamidinio gelio elektroforezė.
TAE	Tris-acetatinis EDTA.
TBE	Tris-boratinis EDTA.
TE	Tris-EDTA.
TEMED	N,N,N,N-tetrametiletildiaminas.

Įvadas

Fermentai yra svarbus šiuolaikinės biotechnologijos įrankis. Daugeliu atvejų įprastinių fermentų, kurie randami gamtoje, neužtenka. Siekiant patenkinti vis augančius biotechnologijos poreikius, tenka juos tobulinti, suteikiant jiems naujų savybių, tokių kaip atsparumas aukštai temperatūrai ar didelei druskų koncentracijai. Visus taikomus metodus, kurie yra naudojami keičiant fermento savybes norima linkme, galima būtų suskirstyti į dvi pagrindines grupes: i) evoliucija *in vitro*, ii) racionalus dizainas.

Evoliucija *in vitro* vyksta mėgintuvėlyje realizuojant atrankos sistemą. Sukuriamas genų bankas iš atsitiktinių genų variantų ir iš daugybės galimų kombinacijų dėl dirbtinai vykdomos atrankos atrenkamos pačios geriausios baltymo mutacijos. Šiuo atveju nėra būtina *a priori* žinoti, koku principu reikia parinkti mutacijas norimoms fermento savybėms suteikti ar pagerinti. Reikiamos mutacijos, jeigu tik jos bus pradiniam genų variantų rinkinyje, bus atrinktos dėl suteikiamo pageidaujamo baltymo fenotipo. Esminis uždavinys evoliucijos *in vitro* atveju yra dirbtinio evoliucinio spaudimo sukūrimas. Evoliucinį spaudimą sukurti yra sąlygiškai paprasta, kuomet yra evoliucionuojami fermentai, galintys padauginti genetinę medžiagą, koduojančią juos pačius, pvz. DNR/RNR polimerazės. Taip pat evoliuciją *in vitro* realizuoti galima, kada reikiamo fenotipo baltymą, įvairiais būdais apjungtą su koduojančia DNR, įmanoma praturtinti fiziniaisiais metodais, pvz. remiantis afiniškumu. Deja, situacija tampa komplikauta, kuomet evoliucijos *in vitro* metodais bandoma pagerinti savybes fermentų, kurie nespecifiškai skaldo genetinės informacijos nešėją DNR/RNR, tokių kaip DNazė I, nes tampa sudėtinga išlaikyti susietus pasikeitusį baltymo

fenotipą ir jį koduojančią informaciją.

Kaip alternatyva evoliucijai *in vitro* dažnai gali būti panaudotas racionalus dizainas. Taikant racionalų dizainą esminė problema yra tai, kad reikia tiksliai žinoti principus, kaip ir kodėl reikia keisti baltymą, kad jo savybės pasikeistų norima linkme. Kuo mažiau žinoma apie šiuos principus, tuo didesnę imtį galimų geresnių baltymo mutantų reikia patikrinti ir atvirkščiai. Galima išskirti dvi grupes metodų, leidžiančių išsiaiškinti šiuos principus.

Pirmiausia, naudojantis skaičiuojamosios biologijos metodais galime kurti modelius, prognozuojančius, kaip konkreti mutacija keis baltymo savybes. Modeliui sukurti bei testuoti šiuo atveju reikia sukaupti daug duomenų, siejančių konkrečias baltymo mutacijas ir pasireiškiantį eksperimentiškai nustatytą baltymo fenotipą. Pavyzdžiui, pagal literatūroje žinomas įvairių baltymų taškines mutacijas bei atitinkančius baltymo stabilumo duomenis galima sukurti prognostinį modelį ir, remiantis juo, prognozuoti baltymo, kurio savybes norima keisti, stabilizuojančias ar destabilizuojančias mutacijas.

Antra metodų grupė analizuoja natūralią mutagenezę, kuri vyko evoliucijai baltymą pritaikant prie įvairių aplinkos sąlygų. Biotechnologijoje naudojamus fermentus dažnai reikia adaptuoti prie neįprastų sąlygų ar suteikti netipines savybes, tokias kaip atsparumą joninei jėgai, temperatūrai arba, atvirkščiai, termolabilumą. Galima mokytis iš gamtos, kokiu principu įmanoma suteikti tokias savybes, bandydami suprasti, kuo ekstremaliose sąlygose galinčių gyventi organizmų fermentai skiriasi nuo fermentų, randamų ne ekstremaliomis sąlygomis gyvenančiuose organizmuose.

Šiame darbe prokariotai bei jų fermentai pagal atsparumą druskingumui skirstomi į druskingumui pakančius (angl. *halotolerant*) ir halofilinius. Halofiliškumas šio darbo kontekste reiškia, kad fermento veikimo / organizmo augimo optimumas yra sąlygiškai didelėje druskos koncentracijoje. Pakantumas druskingumui reiškia, kad, druskingumui didėjant iki

sąlygiškai didelės druskos koncentracijos, fermento aktyvumas išlieka arba mikroorganizmas gali augti.

Šiame darbe buvo stengiamasi perprasti, kaip evoliucija DNazės I šeimos baltymus, kurie randami halofiliniuose / druskingumui pakančiuose prokariotuose, adaptavo prie didelio druskingumo.

Darbo tikslas:

Ištirti prokariotinių DNazės I homologų adaptacijos mechanizmus, leidžiančius prisitaikyti prie didelių druskos koncentracijų, ir įrodyti, kad atrasti dėsniumai gali būti pritaikomi praktikoje, siekiant gauti fermentų variantus, pasižyminčius padidintu atsparumu joninei jėgai.

Tiksliui įgyvendinti iškelti uždaviniai:

1. Sudaryti prokariotinių DNazės I homologų filogenetinį medį.
2. Įvertinti galimas sąsajas tarp DNazės I prokariotinių homologų adaptacijos joninei jėgai bei jų domeninės organizacijos.
3. Eksperimentiškai patikrinti domeninės organizacijos bei atsparumo joninei jėgai sąryšį.
4. Bioinformatiniais metodais palyginti jaučio DNazės I bei keleto halofilinių / druskingumui pakančių prokariotinių DNazės I homologų paviršiaus elektrostazines savybes bei įvertinti vieno homologo paviršinių aminorūgščių konservatyvumą.
5. Sudaryti dvigubą HhH motyvą turinčių bakterinių domenų filogenetinį medį ir nustatyti domeno, randamo bakteriniuose DNazės I homologue, kilmę.
6. Parinkti domenus liejiniams su jaučio DNaze I konstruoti ir sukurti chimerines DNazes.

7. Eksperimentiškai įvertinti gautų liejinių aktyvumą skirtingose joninėse jėgose.
8. Bioinformatiniais metodais įvertinti domenų, naudotų chimerinių DNazių kūrimui, savybes bei sąveiką su DNR.

Mokslinis naujumas ir praktinė vertė:

1. Nustatyta, kad DNazės I prokariotinių homologų adaptacijai prie didelių druskų koncentracijų yra svarbi domeninė organizacija.
2. Lyginant prokariotinių DNazės I homologų domenines organizacijas, parodyta, kad dvigubo HhH motyvo domenas randamas tik DNazės I homologuese iš halofilinių / druskingumui pakančių bakterijų.
3. Parodyta, kad dvigubo HhH motyvo domenas, prilietas prie DNazės I, padidina atsparumą joninei jėgai (pateikta patentinė paraiška).
4. *In vitro* imituotas evoliucinis žingsnis, kuomet, DNazės I šeimos baltymams prisitaikant prie didelio druskingumo, buvo apjungti DNazės I bei dvigubo HhH motyvo domenai.

Šio darbo ginamieji teiginiai:

1. Papildomi su DNR sąveikaujantys domenai prokariotinėse DNazėse gali būti evoliucinė adaptacija, leidžianti išlaikyti fermentinį aktyvumą didelės joninės jėgos sąlygomis.
2. C-galinis su DNR sąveikaujantis domenas yra esminis faktorius, lemiantis DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* pakantumą druskingumui.
3. DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* DNazinio domeno paviršiuje yra daugiau rūgštinių aminorūgščių lyginant su homologo, nepasižyminčio pakantumu druskingumui, paviršiumi.

-
4. Dvigubo HhH motyvo domenas *Thioalkalivibrio sp. K90mix* DNazėje yra giminingas ComE/ComEA šeimos baltymams, susijusiems su bakterinės kompetencijos sistema.
 5. Galima padidinti nepakančios druskingumui DNazės I atsparumą joninei jėgai, remiantis prokariotinės DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* domenine organizacija ir kuriant analogišką liejinį.
 6. Atsparumo didelei joninei jėgai skirtumas tarp dviejų sukurtų liejinių gali būti siejamas su priliėtų domenų ir DNR sąveikų skirtumais.

Literatūros apžvalga

1.1. Bendrosios DNazės I savybės

Jaučio (jaučio kasos) deoksiribonukleazė I (DNazė I) yra geriausiai charakterizuota DNazė. Šis fermentas yra į virškinimo traktą sekretuojama glikozilinta nukleazė [1, 2]. Jos aktyvumui yra būtini divalenčiai metalo jonai (Ca^{2+} ir Mg^{2+}), pH optimumas yra tarp 7 ir 8, molekulinė masė yra ~ 31 kDa. Pagal kristalografinę struktūrą [3] DNazė I yra kompaktiškas α/β susilankstymo (angl. *fold*) tipo baltymas.

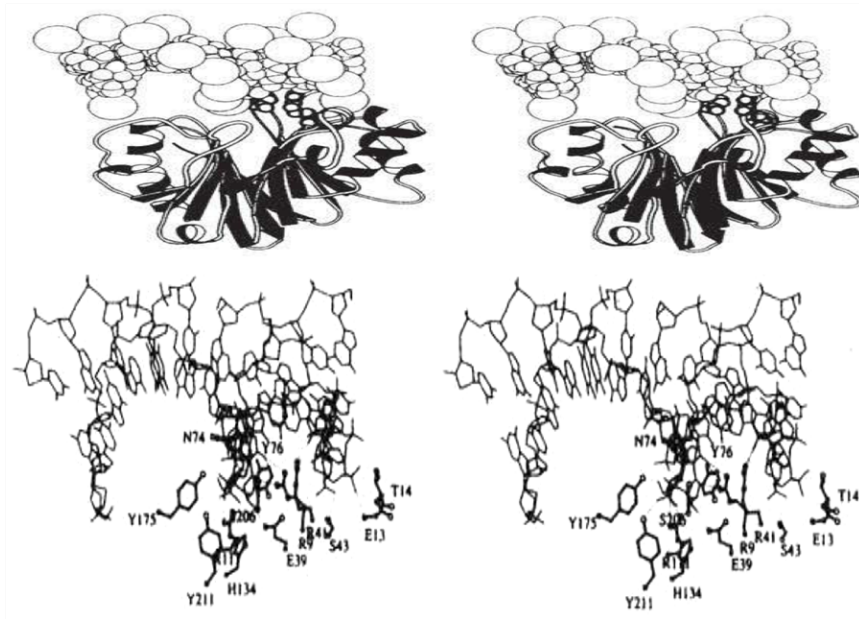
DNazė I naudojama biotechnologijoje įvairiuose taikymuose, kuriuose norima gauti RNR preparatus, neturinčius priemaišinės DNR [4–6], pavyzdžiui, norint pašalinti genomine DNR prieš RNR detekciją [4]. Jautinės DNazės I aktyvumas yra stipriai slopinamas didinant buferio joninę jėgą. Tai yra didelis trūkumas naudojant šį fermentą biotechnologijoje, nes dauguma buferių, naudojamų gryninant ar analizuojant RNR, turi ženklus druskų kiekius.

1.2. Katalizės mechanizmas

Šiame skyrelyje nurodomi aminorūgščių numeriai bei pateikiamos charakteristikos atitinka jaučio DNazę I. DNazė I (EC 3.1.21.1) yra fermentas, hidrolizuojantis tiek dvigrandės, tiek viengrandės DNR fosfodiesterines jungtis. DNazė I dvigrandę DNR hidrolizuoja 100 - 500 kartų efektyviau nei viengrandį substratą [8]. Katalizės metu susidaro oligonukleotidai, 3' gale turintys hidroksilo grupę, o 5' gale – fosfatinę grupę. Fosfodiesterinės jungties hidrolizei būtina bazė - protonų akceptorius, kuris galėtų akty-

tai [12]. Molekulinis modeliavimas ir analizė atlikta Gueroult ir kit. [13] parodė, kad tik vienas Mg^{2+} (koordinuojamas E39) jonas veikia kaip Lewis rūgštis, o kitas jonas stabilizuoja aktyviojo centro struktūrą.

1.3. Sąveika su DNR



1.2 pav. Erdvinė DNazės I – DNR komplekso struktūros schema. Viršutinėje dalyje parodyta R41 ir Y76 sąveika su mažuoju DNR grioviu. Apatinėje dalyje pavaizduoti baltymo – DNR kontaktai [14].

1.3.1. Kontaktai su DNR

Pagal DNR-DNazės kristalografines struktūras [11, 15] DNazė sąveikauja su viena B tipo DNR spiralės puse ir sudaro sąveikas tik su fosfodiesteriniu karkasu ir nukleorūgštimis, esančiomis mažajame DNR griovyje (1.2 pav.) Sąveika su DNR apima 4-6-ias fosfatines grupes. Mažesnio ilgio nukleotidai karpomi neefektyviai [16]. Tuo tarpu kristalografinė DNR-DNazės I komplekso struktūra [14] akivaizdžiai rodo, kad ilgesniems DNR fragmentams sąveikaujant su DNaze I, DNR konformacija keičiasi. Įgauvant katalizei reikalingą DNR konfigūraciją, lemiamą vaidmenį atlieka dvi paviršinės aminorūgštys: Y76 (stekingo sąveika) ir R41 (sąveika vandenilniais ryšiais su priešinga grandine). Dėl sąveikos su DNaze, DNR dupleksas

palinksta 20° link didžiojo griovio ir tokiu būdu įvyksta fizinis jo susiaurėjimas per 3 \AA ir praplatėja mažasis griovys. Tuo tarpu DNazė pati savaime yra gana rigidiška – RMSD skirtumas tarp DNazės I struktūros komplekse su DNR ir laisvo baltymo struktūros yra tik $0,49 \text{ \AA}$, t.y. iš esmės nesikeičia.

1.3.2. Sąsaja tarp sąveikos su DNR ir aktyviojo centro

Y76 aminorūgštis yra būtina tinkamai sąveikai su DNR. Ši aminorūgštis tiesiogiai nedalyvauja pačioje rūgštinėje-bazinėje katalizėje, bet užtikrina, kaip žemiau aptarta, tinkamą substrato orientaciją.

Y76 funkcija buvo nustatyta remiantis taškinės mutagenezės rezultatais. Analizuojant kristalografines struktūras [10,11] tampa aišku, kad Y76 dalyvauja vandeniliniiais ryšiais sąveikaujančių aminorūgščių Y76-E78-H134 triadoje, be to Y76 žiedas sąveikauja su DNR mažojo griovio ribozės žiedu per stekingo sąveiką. Y76 mutacijos į E, L, Q, W padidina giminingumą DNR, bet ženkliai sumažina aktyvumą, nes dėl pakitusių vandenilinių ryšių tinklelio H134 bei E76 negali užimti reikiamų pozicijų katalizei. Taip pat su aktyviuoju centru sąveikaujanti DNR neįgauna katalizei optimalios konformacijos (išlenkimas) [17]. Y76F mutacija sumažina aktyvumą $\sim 20 \%$ [18]. Šioje pozicijoje F kaip ir Y sąveikauja su DNR, bet negalima dalyvauti aktyvųjų centrą stabilizuojančiame vandeniliniame ryšyje su E78-H134 [18].

Taigi, remiantis literatūriniais duomenimis, Y76 per aromatinio žiedo stekingo sąveiką išlenkia DNR struktūrą ir dėl to kerpama fosfatinė jungtis yra tinkamai orientuojama aktyviajame centre. Be to, Y76 sąveika su E78-H134 užtikrina jų tinkamą katalizei orientaciją. Kaip matome, Y76 apjungia DNR sąveiką su baltymu ir fosfodiesterinio ryšio hidrolizę.

1.3.3. DNR lankstumo svarba

Taigi, sąveikaujant su DNaze, DNR turi išsilenkti. Buvo nustatyta, kad srityse, kuriose gausu A, DNR savaime išsilenkia link mažojo griovio [19] ir

jis susiaurėja. Taigi tokiose srityse DNazės aktyvumas turėtų būti mažesnis. Kelios studijos tai patvirtino. Sutton ir kiti [20] parodė, kad DNazės I karpymui yra dalinai atsparios A/T turtingos sekos. Kuo ilgesnė A/T turtinga sritis – tuo mažesnis karpymo efektyvumas dėl siauresnio mažojo griovio bei mažesnio lokalaus DNR lankstumo. Tačiau DNazė I gali kirpti ties visomis 4-turiomis bazėmis: efektyvumas, priklausomai nuo bazės, skiriasi ne daugiau nei 3 kartus. Detaliau DNazės specifiškumas buvo tirtas remiantis naujos kartos sekoskaitos duomenimis [21], kurie parodė, kad DNazės I katalizės greitį lemia trys bazės abipus kerpamo fosfatinio ryšio ir, priklausomai nuo mažojo griovio pločio, jis gali skirtis daugiau nei du kartus. Studijoje, atliktoje Heddi ir kit. [22], buvo siejami BMR oligonukleotidų spektro duomenys su tikimybe, kad DNazė I kirps konkrečioje vietoje. Šie tyrimai, tai pat kaip ir ankstesnės studijos, parodė, kad katalizės efektyvumas priklauso nuo DNR lankstumo.

Kaip matome, daug studijų parodė, kad DNazės I katalizės efektyvumas yra atvirkščiai proporcingas mažojo DNR griovio siaurumui bei lankstumui ir tai gali būti siejama su palankesnėmis sąlygomis Y76 sąveikai su DNR. Taip pat tai gali paaiškinti, kodėl DNR-DNR-RNR hibride yra labai silpnai skaldoma [14]: DNR-RNR hibridas tirpale yra A tipo spiralinės konformacijos, kuri turi ženkliai siauresnį mažąjį griovį nei B tipo spiralė.

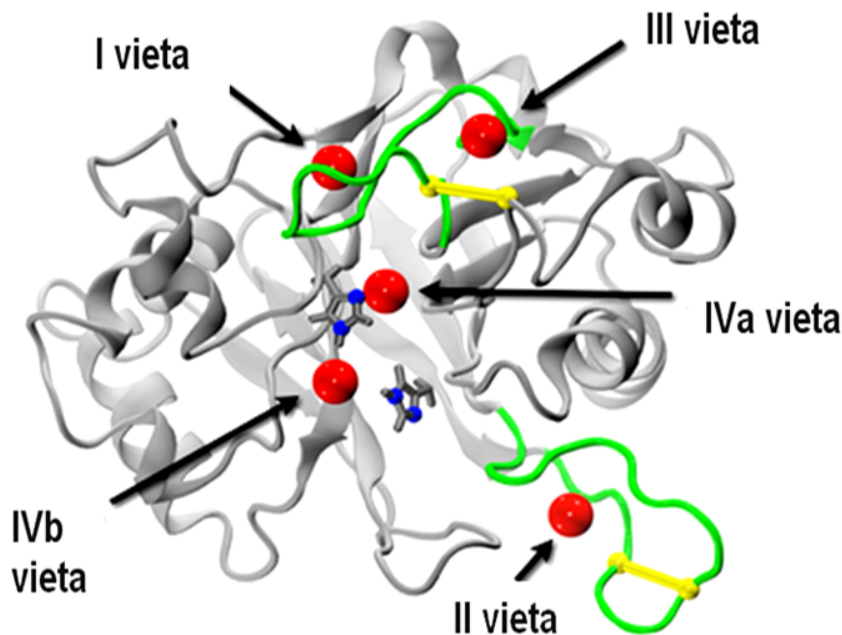
Kaip aptarta žemiau, DNazės I sąveikai su DNR yra itin svarbūs metalo jonai.

1.3.4. Metalų jonų svarba

Yra žinoma, kad DNazės I veikimui yra būtini divalenčiai kofaktoriai ir aktyviausia DNazė I yra tada, kada reakcijos buferyje yra Mg^{2+} arba Mn^{2+} jonai kartu su Ca^{2+} jonais [23]. Esant tik vieno tipo kofaktoriams (arba tik Mg^{2+} , arba tik Ca^{2+}) DNazės I aktyvumas yra ~ 100 kartų mažesnis nei tuomet, kai reakcijos buferyje yra abiejų jonų. Nesant divalenčių katijonų, fermento aktyvumas nedetektuojamas [24]. Remiantis egzis-

tuojančiomis kristalografinėmis struktūromis bei molekulinio modeliavimo dvivalenčių jonų svarba išsamiai aprašyta studijoje, atliktoje Gueroult ir kit. [13].

Remiantis kristalografinėmis struktūromis yra numanomos penkios jonų rišimo vietos (1.3 pav.). Nei vienoje kristalografinėje struktūroje nebuvo aptikti Mg^{2+} jonai aktyviajame centre. Literatūroje yra tik daromos prielaidos apie jų buvimą. Šios dvi jonų buvimo vietos 1.3 pav. žymimos kaip IVa ir IVb. Už aktyviojo centro kristalografinėse struktūrose yra nustatytos trys dvivalenčių jonų rišimo vietos: dvi riša Ca^{2+} , viena Ca^{2+} arba Mg^{2+} (I, II, III rišimo vietos 1.3 pav.).



1.3 pav. DNazės I kofaktorių surišimo sritys. Keturios katijonų surišimo vietos pažymėtos nuo I iki IVa/b, jas žymi raudonos sferos. Greta esančios kilpinės sritys pažymėtos žalia spalva, disulfidiniai tilteliai – geltona. Greta IVa ir IVb esančių katalizinių histidinių šoninės grupės pavaizduotos pilkais ir mėlynais lazdelių fragmentais). Šaltinis: [13].

Gueroult ir kit. [13] atliktas molekulinis modeliavimas leido įvertinti visų penkių galimų dvivalenčių jonų rišimo vietų svarbą baltymo stabilumui bei prieinamumą tirpikliui. Ca^{2+} pašalinimas iš esmės neturėjo įtakos baltymo stabilumui, tuo tarpu II jonų rišimo vietoje Ca^{2+} pakeitus Na^{+} buvo stebimas ženklus natyvos struktūros suardymas. Ca^{2+} šioje vietoje sta-

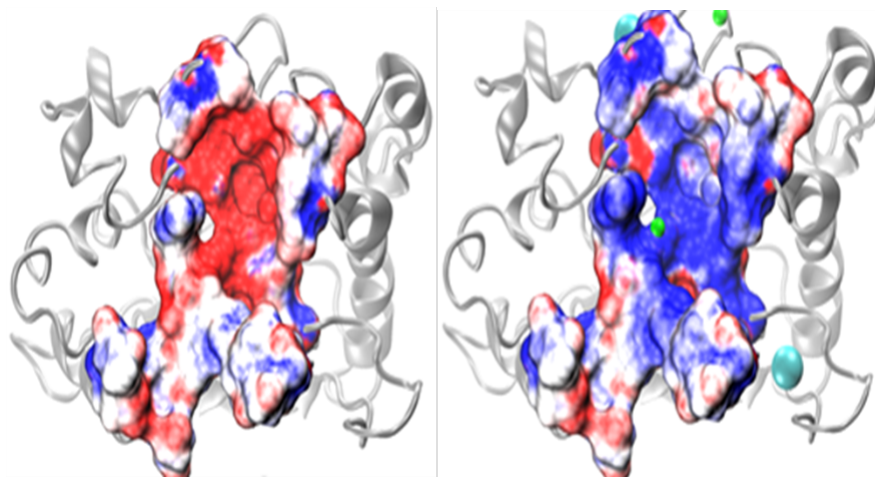
bilizuoja kilpą ir palaiko natyvią konformaciją. Mg^{2+} III vietoje baltymo stabilumui įtakos neturėjo, tačiau mažino disulfidinio tiltelio prieinamumą tirpikliui (C173 prieinamumą). Tai galimai lemia eksperimentiškai stebimą intensyvesnę redukciją merkaptoetanolio, kuomet per mutaciją D210A yra suardyta ši metalo jonų rišimo vieta ir yra maža Ca^{2+} koncentracija (0,1 mM) [25].

Analizė, atlikta Gueroult ir kit. [13], atskleidė, kad vienas iš aktyviojo centro Mg^{2+} jonų (1.3 IVa pav.), kuris yra koordinuojamas D168, D212, H252 šoninių grupių, yra baltymo gilumoje ir yra neprieinamas tirpikliui. Taigi yra labai maža tikimybė, kad šis Mg^{2+} sąveikauja su kerpama fosfato grupe, o katalizei yra svarbus tinkamai orientuojant aktyviajame centre katalizinį histidiną H252. Tuo tarpu kitas aktyviojo centro magnio jonas (1.3 IVb pav.) yra koordinuojamas tik vienos aminorūgšties (E39) ir yra labai gerai prieinamas tirpikliui. Tai leistų šiam metalo jonui dalyvauti katalizėje ir stabilizuoti tarpinę būseną.

Molekulinis modeliavimas [13] atskleidė dar vieną, katalizei kritinę, divalenčių kofaktorių funkciją. DNazės I paviršius be prijungtų jonų turi neigiamą elektrostatinį potencialą (1.4 pav.) ir negali sąveikauti su neigiamo krūvio DNR. DNazės paviršiui reikia papildomų aštuonių teigiamų krūvių (keturių jonų), kad jis taptų elektrostatiškai teigiamas ir galėtų formuoti kompleksą su DNR.

Taigi aukščiau pateikti literatūriniai duomenys rodo, kad metalo jonai yra svarbūs keturiais aspektais:

1. stabilizuoja baltymo struktūrą;
2. vienas Mg^{2+} jonas dalyvauja kaip Lewis rūgštis stabilizuojant tarpinį junginį katalizėje;
3. vienas Mg^{2+} jonas stabilizuoja aktyviojo centro struktūrą;
4. dalyvauja komplekso su DNR sudaryme.



1.4 pav. Elektrostatinio potencialo pokyčiai esant ir ne metalo jonams DNazės I ir DNR sąveikos paviršiuje. Raudona spalva pažymėtos neigiamo krūvio sritys, mėlyna – teigiamo. Kairysis paveikslas rodo elektrostatinio potencialo žemėlapi, nesant divalenčių metalu jonų, dešinysis – esant prijungtiems divalenčiams katijonams. Šaltinis: [13]

1.3.5. Bandymai taškinėmis mutacijomis padidinti sąveiką su DNR

Akivaizdu, kad DNazė I be prijungtų divalenčių jonų nėra giminiga DNR, o sustiprinta sąveika su DNR turėtų padidinti DNazės katalizinę efektyvumą ir atsparumą joninei jėgai, kuri ekranuoja elektrostatines sąveikas ir itin apsunkina DNazės I-DNR komplekso formavimą. Remiantis DNazės I kristalografinėmis struktūromis buvo bandoma į žmogaus DNazės I DNR rišantį paviršių įvesti papildomus teigiamus krūvius, galimai padidinančius sąveiką su DNR [24,26,27]. Taip buvo sukurti joninei jėgai atsparesni ir aktyvesni žmogaus DNazės I variantai. Įdomu pastebėti, kad įvedus papildomus teigiamus krūvius DNazės I sąveikos su DNR paviršiuje, dalies tokių mutantų Ca^{2+} poreikis efektyviai DNR hidrolizei eliminuotas. Tai paaiškinama tuo, kad esant papildomoms teigiamų aminorūgščių šoninėms grupėms, jonų prisijungimas sąveikos su DNR paviršiuje nėra būtinas.

1.4. Bakterinės sekretuojamos nukleazės

Šiame darbe ieškant sąsajų tarp domeninės struktūros ir adaptacijos prie didelės joninės jėgos buvo analizuojamos į eukariotinę DNazę I pana-

šios DNazės iš prokariotinių mikroorganizmų ir ieškoma sekrecijos signalų jų sekose. Literatūroje nepavyko aptikti duomenų apie DNazės I homologus prokariotuose. Taigi šiame skyriuje apžvelgiami literatūroje prieinami duomenys apie galimas sekretuojamų nukleazių funkcijas ir apie charakterizuotas halofilines / druskingumui pakančias nukleazes.

1.4.1. Galimos bakterinių sekretuojamų nukleazių funkcijos

Aptikta nemažai literatūros šaltinių, kuriuose aptariama galima sekretuojamų nukleazių biologinė funkcija. Tyrimai rodo, kad tokios nukleazės gali būti svarbios formuojantis ir irstant bioplėvelėms. Dauguma bakterijų gyvena ne pavieniui, o grupėmis – kolonijomis, kurias į visumą apjungia bioplėvelės. Esminiai bioplėvelės komponentai: polisacharidai, baltymai, fimbrijos, pilės, žiuželiai ir užląstelinė DNR [28]. DNR yra vienas iš svarbiausių struktūrinių bioplėvelės komponentų ir veikia kaip natūralūs „klijai“, palaikantys bakterinių ląstelių kontaktą tarpusavyje ir su substratu [28].

DNR yra itin svarbi pradiniais bioplėvelės brendimo etapais, kuomet ląstelės išskiria viduląstelinę DNR į išorę, kur ji funkcionuoja kaip struktūrinis bioplėvelės komponentas bei dalyvauja keičiantis genetinė informacija [29, 30]. Yra parodyta, kad sekretuojamos nukleazės yra svarbios bioplėvelės formavimuisi: pastarųjų neturintys *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* ir *V. cholerae* mutantai pasižymi tankesnėmis bei storesnėmis bioplėvelėmis lyginant su laukinio tipo atstovais [29, 31]. Būtų galima išskirti bent tris biologines funkcijas, kurias gali atlikti sekretuojamos bakterinės nukleazės:

- subrendusios bioplėvelės suardymas ir ląstelių išlaisvinimas [32];
- apsauga nuo konkuruojančių mikroorganizmų kolonijų kaimynystės, neleidžiant formuoti bioplėvelės [32];
- ekstraląstelinės DNR hidrolizė, įgalinant jos panaudojimą kaip mais-

tinių medžiagų šaltinį [33].

1.4.2. Halofilinės / druskingumui pakančios nukleazės

Literatūroje pavyko rasti duomenų apie keletą charakterizuotų nukleazių iš halofilinių / druskingumui pakančių organizmų. Pirmoji žinoma halofilinė nukleazė buvo išskirta iš halofilo *Micrococcus sp.* – nukleazė H [34, 35]. Šios nukleazės optimali NaCl koncentracija 2,9 M. Tai 99 kDa fermentas, kuriam būdingas ribonukleazinis ir deoksiribonukleazinis aktyvumai. Parodyta, kad šio fermento aktyvumui reikalingi Mg^{2+} ir Mn^{2+} . Kita 138 kDa halofilinė nukleazė, gebanti hidrolizuoti tiek RNR tiek DNR, buvo išskirta iš halofilinės bakterijos *Bacillus sp.* [36]. Ši nukleazė yra kiek atsparesnė joninei jėgai nei anksčiau aptartoji. NaCl koncentracijos optimumas yra 1,4-3,2 M NaCl, o aktyvumui reikalingi Ca^{2+} ir Mg^{2+} . Literatūroje minima ir viena ribonukleazė, pasižyminti halofilinėmis savybėmis. Tai 61 kDa fermentas, gautas iš halofilo *Pseudomonas sp.*, kuriam būdingas didžiausias aktyvumas esant 3 M NaCl [37].

Aukščiau minėtų nukleazių atvejais literatūroje buvo tiesiog nurodoma, kad nukleazės yra halofilinės, bet tai įgalinantis mechanizmas nebuvo tirtas. Pavyko rasti informacijos tik apie vieną druskingumui pakančią nukleazę, kurios atsparumo mechanizmas buvo tirtas – endonukleazė iš *Vibrio salmonicida* [38]. Šios nukleazės veikimo optimumas stebimas ties 0,5 NaCl. Lyginant su mezofiliniu homologu iš *Vibrio cholerae* bei tiriant taškinius mutantus buvo parodyta, kad esminis adaptacijos prie druskingumo mechanizmas šios nukleazės atveju yra labiau teigiamas elektrostatinis paviršiaus potencialas, sąveikos su DNR paviršiuje.

1.5. Halofilinių / druskingumui pakančių fermentų savybės

Sekretuojamos prokariotinės DNazės turėtų būti prisitaikiusios prie druskingos aplinkos taip kaip ir kiti druskingumui atsparių organizmų fer-

mentai. Gerai žinoma, kad daugelis fermentų iš itin halofilinių ar druskingumui pakančių organizmų yra stabilūs ir išlieka aktyvūs net ir esant didelei druskų koncentracijai. Yra gerai žinoma, kad didelė joninė jėga slopina elektrostazines sąveikas ir stiprina hidrofobines. Didėjant joninėms elektrostatinio atostūmio jėgoms tarp atskirų mezofilinio baltymo molekulių, mažėja tirpumas ir energetiškai palankesnis tampa baltymo agregacijos procesas. Tuo tarpu druskingumui pakantūs baltymai, esant didelėms druskos koncentracijoms, neagreguoja [39–41].

Buvo nustatyta, kad prisitaikant prie didelio druskingumo, baltymų aminorūgščių sudėtis kinta: daugėja rūgštinių, neigiamą krūvį turinčių aminorūgščių liekanų, ir mažėja hidrofobinių, ypač aromatinių, aminorūgščių [39, 42–44]. Lyginant halofilinių ir nehalofilinių organizmų proteomus tapo akivaizdu, kad halofilinių organizmų baltymuose yra ženkliai daugiau aspartato ir glutamato ir mažiau lizino (jį daugeliu atvejų keičia argininas) [45, 46]. Baltymo paviršiuje susikaupę karboksilatai (aspartato ir glutamato šoninės grupės) jungia hidratuotus katijonus ir taip lemia didesnę baltymo paviršiaus solvataciją. Taip išvengiama sąveikos tarp hidrofobinių paviršiaus fragmentų bei agregacijos [47, 48].

Kaip prie didelių druskos koncentracijų prisitaiko su DNR sąveikaujantys baltymai? Literatūra nepateikia vienareikšmiško atsakymo. Analizė, atlikta Becker ir kit. [49], rodo, kad lyginant halofilinius ir mezofilinius organizmus, sąveikos su nukleorūgštimis paviršiuje neigiamo krūvio aminorūgštys nesikaupia. Toks efektas buvo stebėtas analizuojant su TATA dėžute sąveikaujantčius baltymus (angl. *TATA-binding*) ir ribosomos pratęsimo faktorių α -1. Šios studijos autoriai rašo, kad galima neigiamų rūgštinių aminorūgščių nesikaupimo priežastis yra ta, kad nukleino rūgštis rišančius baltymus veikia evoliucinis spaudimas, siekiantis išlaikyti efektyvią sąveiką su DNR.

Kiti tyrimai vis dėlto rodo, kad ir sąveikos su nukleorūgštimi paviršiuje gali būti kaupiamos neigiamo krūvio aminorūgštys. Lyginant hiperhalofi-

lo *Haloferax volcanii* PCNA baltymą su mezofiliniu homologu [50] DNR sąveikos srityse yra stebimas akivaizdus neigiamo krūvio aminorūgščių padaugėjimas. Tai aiškinama tuo, kad sąveikai su DNR tarpininkauja su karboksilatais sąveikaujantys katijonai. Taip pat analizuojant su TATA dėžute sąveikaujantį baltymą iš *Pyrococcus woesei* [51] buvo parodyta, kad atsparumą druskingumui lemia sąveikos su DNR paviršiuje esantys karboksilatai, rišantys katijonus. Juos pašalinus, atsparumas joninei jėgai sumažėjo.

Viena studija leidžia teigti, kad vykstant adaptacijai prie didėjančios joninės jėgos, sąveikos su DNR paviršiuje gali padaugėti ne neigiamo, bet teigiamo krūvio aminorūgščių, didinančių teigiamo krūvio paviršiaus potencialą [38]. Reikėtų pabrėžti, kad šios studijos atveju fermentas (endonukleazė I) buvo ne halofilinė, o pakanti druskingumui – organizmas buvo prisitaikęs prie sąlygiškai mažo jūros vandens druskingumo.

Taigi pagal literatūros duomenis nėra aišku, ar prisitaikant prie didelių druskos koncentracijų neigiamo krūvio aminorūgštys kaupiasi sąveikos su DNR paviršiuje. Tikėtina, kad karboksilatų kaupimasis apsunkina sąveiką su DNR dėl neigiamo krūvio, bet – jei katijonų koncentracija yra pakankama – katijonai tampa sąveikos su DNR tarpininkais. Tokiu būdu DNR komplekso formavimas tampa suderinamas su neigiamo krūvio paviršinėmis aminorūgštėmis. Tačiau tokia adaptacija būtų netinkama druskingumui pakančių (nehalofilinių) organizmų atveju: patekus į mažai katijonų turinčią aplinką karboksilatai sąveikos su DNR paviršiuje trukdytų formuoti kompleksą su DNR. Taigi tikėtina, kad druskingumui pakantūs fermentai prie didesnės joninės jėgos prisitaiko per papildomas teigiamo krūvio aminorūgštis ir didesnę teigiamą sąveikos su DNR paviršiaus potencialą taip, kaip *Vibrio salmonicida* nukleazė [38].

1.6. HhH motyvas

Šiame skyrelyje aptariami literatūros duomenys apie HhH motyvą bei *B. subtilis* ComEA baltymą, kurio dvigubo HhH motyvo domenai šiame darbe buvo prilietai prie DNazės I.

1.6.1. HhH motyvas ir ComEA baltymas

B. subtilis kompetencijos sistema ir baltymas ComEA buvo analizuoti dvejose studijose [52, 53]. Buvo nustatyta, kad *Bacillus subtilis* pasižymi natūralia kompetencija – gebėjimu iš aplinkos įsisavinti ekstraląstelinę genetinę medžiagą ir realizuoti jos koduojamą informaciją. Vienas esminių *B. subtilis* baltymų, atsakingų už natūralią kompetenciją, yra baltymas ComEA. Šis baltymas sudarytas iš dviejų domenų. N-galinis domenas sąveikauja su plazmine membrana ir įtvirtina baltymą ląstelės paviršiuje. C-galinis domenas veikia kaip dvigrandės DNR receptorių ir sąveikauja su užląsteline DNR, kuri, veikiant kitiems natūralios kompetencijos sistemos komponentams, yra pernešama į ląstelės vidų. Yra nustatyta, kad C-galinio domeno sąveikos su DNR K_d yra ~ 500 nM ir jis yra ženkliai gimi-ningesnis dvigrandei DNR nei viengrandei [52]. Šis domenas yra sudarytas iš dviejų spiralė – plaukų segtukas – spiralė (HhH) (angl. *helix-hairpin-helix*), motyvų (kiekvienas ~ 30 aminorūgščių ilgio).

HhH yra nespecifiškai su DNR sąveikaujantis motyvas, aptinkamas daugelyje baltymų šeimų. Dauguma jų – įvairūs su DNR sąveikaujantys fermentai. HhH motyvas baltymo sekoje aptinkamas pavieniui arba kaip du ar keturi iš eilės einantys tandeminiai pasikartojimai [54]. Dauguma HhH motyvų aptinkami dvigubą HhH motyvą turinčiuose domenuose [55], kurie apima penkis spiralinius fragmentus: po du kiekviename HhH motyve ir vieną – motyvus jungiančioje srityje. Kai kuriose nukleazėse aptinkamuose HhH motyvuose „plaukų segtuko“ sritis yra ilgesnė nei tipiniame HhH ir vadinama „linkiu“ (angl. *turn*). Tokiais atvejais motyvas vadinamas H3TH motyvu (du papildomi linkiai vietoj vieno linkio nei

tipiniame HhH). Nepaisant tokio skirtumo H3TH ir HhH yra akivaizdūs homologai [55].

Pagal literatūros duomenis skirtingi dvigubo HhH motyvo domenai sąveikauja su DNR skirtingai. Pagal apibendrinimus, pateiktus studijoje atliktoje Shao ir kit. [55], HhH motyvas sąveikauja su DNR per vandenilines jungtis tarp DNR fosfatinių grupių ir baltymo pagrindinės grandinės azotų. Analizuojant dvigubo HhH motyvo domeną ComEA baltyme iš *Vibrio cholerae* ir modeliujant galimą kompleksą su DNR [56] buvo parodyta, kad pirmojo HhH motyvo lizinai (K62 ir K63) savo šoninėmis grandinėmis sąveikauja su DNR fosfatinėmis grupėmis. Tačiau ComEA homologiniuose baltymuose nė vienas iš šių lizinų nėra absoliučiai konservatyvus [56]. Remiantis turimais literatūriniais duomenimis dvigubo HhH motyvo domeno sąveikoje su DNR esminės yra vandenilinės jungtys su DNR fosfatais – taip užtikrinamas sąveikos nepriklausomumas nuo DNR sekos. Šias vandenilines jungtis su DNR gali formuoti arba baltymo karkaso pagrindinės grandinės azotai, arba teigiamų aminorūgščių šoninės grupės.

1.6.2. Dvigubo HhH motyvo domeno panaudojimas baltymų inžinerijoje

Daug biotechnologijoje naudojamų fermentų sąveikauja su DNR ir natūralu tikėtis, kad bent dalies iš jų aktyvumą ar kitas savybes galima pagerinti sustiprinant / stabilizuojant sąveiką su DNR. Vienas iš būdų tai padaryti – priliesti papildomus DNR rišimo domenų. Šis metodas yra plačiai naudojamas tobulinant biotechnologijoje svarbias DNR polimerazes. HhH motyvus turintys domenai buvo priliesti prie įvairių DNR polimerazių: i) *Thermus aquaticus* (Taq) DNR polimerazės [57], ii) *Pyrococcus furiosus* (Pfu) DNR polimerazės [57], iii) Phi29 DNR polimerazės [58] iv) *Bacillus stearothermophilus* (Bst) DNR plimerazės [59]. Visais šiais atvejais priliestas domenas buvo paimtas iš topoizomerazės V, aptiktos hipertermofilo *Methanopyrus kandleri* genome. Ši topoizomerazė turi 12 dvigubą HhH

motyvą turinčių domenų.

Pavlov ir kit. atliktų tyrimų metu buvo sukurti liejiniai su Pfu ir Taq polimerazėmis priliejančiais fragmentus, turinčius 10-21 HhH motyvų [57]. Kuo daugiau motyvų buvo prilieta – tuo procesyvesnės ir atsparesnės druskingumui buvo sukurtos chimerinės polimerazės [57]. Bst polimerazės atveju buvo prilieta 8-nių HhH motyvų fragmentai [59]. Tuo tarpu Phi29 polimerazės atveju prilieta buvo vienas arba du dvigubo HhH motyvo domenai, o geriausiai praktiniams taikymams tiko liejinys su vienu dvigubo HhH motyvo domenu, nes, autorių manymu, dviejų domenų sukuriama sąveika su DNR apsunkina polimerizaciją, esant dideliems matricinės DNR kiekiams [58]. Prie polimerazių priliejus HhH domenams buvo: i) padidintas procesyvumas, ii) padidintas atsparumas inhibitoriams, iii) padidintas atsparumas joninei jėgai.

Reikėtų pabrėžti, kad literatūroje nebuvo aptikta jokių užuominų, kad priliejančiam DNR rišančiam domenui pavyko pagerinti savybes kitų su DNR sąveikaujančių fermentų (ne DNR polimerazių). Nagrinėjant pavišintą Bio-Rad patentinę paraišką (9-10 apibrėžtys, [60]) yra akivaizdu, kad būta bandymų pagerinti DNazės I savybes priliejančiam DNR rišančiam domenui, bet nepavyko gauti ir pademonstruoti sėkmingų rezultatų.

1.7. DNR rišančių baltymų sąveikos su DNR analizė molekulinio modeliavimo metodais

Vienas iš darbe naudotų metodų yra sąveikos tarp baltymo ir DNR energetikos vertinimas molekulinio modeliavimo metodais. Šiame skyrelyje trumpai apžvelgiami šių metodų principai bei literatūroje pateikiamos sąsajos tarp sąveikų energetikos ir joninės jėgos poveikio aktyvumui.

1.7.1. Laisvosios energijos dedamosios

Šiame darbe baltymo ir DNR sąveika buvo vertinama naudojant patį bendriausią laisvosios sąveikos apskaičiavimo metodą [61], kuris laisvąją

sąveikos energiją skirsto į dvi dedamąsias: i) solvatacijos procesų energetiką ($\Delta G_{solvatacija}$), ii) Kulono (angl. *coulombic*) sąveiką (ΔG_{Kulono}):

$$\Delta G = \Delta G_{solvatacija} + \Delta G_{Kulono}. \quad (1)$$

Šiuo atveju neatsižvelgiama į daugybę entropinių bei kitų nekovalentinių sąveikų dedamųjų. Šiame darbe buvo eksperimentiškai vertinama joninės jėgos įtaka fermentiniam aktyvumui, dėl to esminis dėmesys šiame skyrelyje ir visame darbe yra kreipiamas į laisvosios energijos polinės solvatacijos dedamąją, kurios sąryšis su jonine jėga turi aiškų teorinį pagrindimą [61, 62].

Žemiau aptariama, kokie laisvosios energijos komponentai palaiko DNR-baltymo kompleksų stabilumą.

Studijoje atliktoje Jayaram ir kit. [63] molekulinio modeliavimo metodais buvo vertinami 40-ties baltymo-DNR kompleksų laisvosios energijos dedamosios. Buvo aptikta, kad dauguma atvejų polinės solvatacijos dedamoji buvo energetiškai nepalanki ir savo verte didesnė už visais atvejais palankią Kulono (angl. *coulombic*) baltymo-DNR sąveiką. Studijoje teigiama, kad baltymo-DNR kompleksą palaiko van der Vals'o sąveikos bei kavitacijos (angl. *cavitation*) (hidrofobinė sąveika) laisvosios energijos dedamosios. Įdomu pastebėti, kad polinės solvatacijos dedamoji buvo energetiškai palanki tik dviejų kompleksų atvejais.

Aukščiau minimu atveju [63] polinė solvatacija buvo vertinama naudojantis apibendrintu Born'o metodu (angl. *generalised Born*), kuris yra mažiau tikslus nei daugiau skaičiavimo resursų reikalaujantis Poisson-Boltzman'o metodas [64]. Pastarąjį metodą taikė studija [65], kurioje buvo vertinama polinės solvatacijos sąveikos su DNR dedamoji skirtingiems domenams iš 11-os baltymų (po domeną iš C bei N galų). Šuo atveju keturių domenų (iš 22-jų) polinės solvatacijos dedamoji buvo artima 0 arba teigiama. Pastarosios studijos publikuotuose duomenyse, deja, nėra duomenų apie pilno baltymo sąveikos su DNR laisvosios energijos dedamąją.

Kitoje studijoje [62] polinė solvatacija, teoriškai ją skaičiuojant Poisson-

Boltzman'o metodu, buvo dar papildomai padalinta į nuo joninės jėgos priklausančią ir nepriklausančią dedamąsias. Buvo tirta 20 baltymo-DNR kompleksų. Šiuo atveju buvo nustatyta, kad nuo joninės jėgos priklausanti polinė solvatacija susidarant kompleksams yra energetiškai palanki tik vienu atveju (iš 20), o nuo joninės jėgos nepriklausanti solvatacijos dedamoji (solvatacija apskaičiuota teoriniame tirpiklyje be jonų) energetiškai palanki buvo daugiau nei pusei atvejų. Tuo tarpu Kulono (angl. *coulombic*) bei hidrofobinė sąveikos visų kompleksų atveju buvo palankios.

Apibendrinant dvi studijas [62, 63] yra aišku, kad: i) Kulono (angl. *coulombic*) sąveika yra energetiškai palanki absoliučios daugumos baltymo-DNR kompleksų atvejais, ii) polinė solvatacija dažnai gali būti nepalanki komplekso palaikymui. Ankstesni mažo ligando bei λ cI represoriaus ir DNR tyrimai [66, 67] taip pat rodo, kad kompleksą stabilizuoja Kulono (angl. *coulombic*) sąveikos, o polinė solvatacija yra energetiškai nepalanki.

Bent dalies tirtų kristalografinių baltymo-DNR kompleksų atvejais [62, 63] energetiškai nepalanki polinės solvatacijos laisvosios sąveikos energijos dedamoji gali būti dėl to, kad kristalografinė struktūra, turinti nespecifinės sekos DNR, galimai atitinka tarpinę konformaciją tarp baltymo sąveikos su specifiskai atpažįstama seka ir nespecifinės sąveikos. Tokį atvejį iliustruoja BamHI-DNR sąveikos modeliavimas [68]. Šiuo atveju pagal kristalografinę struktūrą apskaičiuota polinės solvatacijos energija buvo 70,98 kJ/mol, o biocheminius eksperimentinius duomenis (sąveikos priklausomybė nuo joninės jėgos) labiau atitinkančio modelio polinės solvatacijos energija buvo -24,7 kJ/mol (pateiktos vertės atitinka 100 mM vienvalentės druskos aplinką).

Daugelis su DNR sąveikaujančių baltymų, kurių struktūros yra žinomos, yra sekai specifinės. Galbūt sąveikos su DNR laisvosios energijos solvatacijos dedamoji skiriasi sąveikaujant su specifine ir nespecifine DNR seka? Laktozės represoriaus sąveikos su DNR modeliavimo tyrimai [69] parodė, kad polinė solvatacija išlieka energetiškai nepalanki tiek specifi-

nio, tiek nespecifinio komplekso atvejais, o specifinis kompleksas „atpažįstamas“ per papildomas polines sąveikas [70]. Nebuvo aptikta studijų, rodančių, kad specifinės sekos atpažinimas vykėtų per energetiškai palankesnę solvatacijos energiją.

Taigi polinės solvatacijos energija sąveikaujant baltymui ir DNR gali būti energetiškai tiek palanki, tiek nepalanki, o bendroji elektrostatinės prigimties laisvoji energija (polinė solvatacija + Kulono sąveika (angl. *coulombic*)) daugeliu atvejų yra energetiškai palanki dėl stipriai neigiamų Kulono (angl. *coulombic*) sąveikos verčių.

1.7.2. Polinės solvatacijos ir joninės jėgos ryšys

Biomolekulių sąveikoje priklausomybė tarp druskos koncentracijos ir bendrosios sąveikos laisvosios energijos gali būti išreikšta koeficientu (SK_{exp}), kuris atitinka nuokrypio koeficientą linijiniame sąryšyje tarp sąveikos konstantos K_{exp} ir druskos koncentracijos logaritmų [71]:

$$SK_{exp} = \frac{d \ln K_{exp}}{d \ln ([M^{+1}])}; \quad (2)$$

kur K_{exp} – kinetinė konstanta, kuri gali būti išmatuojama eksperimentiškai, esant įvairioms vienvalentės druskos koncentracijoms $[M^{+1}]$.

Eksperimentinę SK_{exp} galima apskaičiuoti ir gauti teorinę vertę SK_{teor} remiantis molekulinio modeliavimo metu gautomis teorinėmis polinės solvatacijos laisvosios energijos dedamosios ($G_{solvatacija}$) vertėmis [68, 72]:

$$SK_{teor} = -\frac{1}{kT} \times \frac{d \Delta G_{solvatacija}}{d \ln ([M^{+1}])}; \quad (3)$$

kur k – Boltzmano konstanta, T – absoliuti temperatūra. Daugeliu atvejų SK_{teor} yra artima SK_{exp} [68, 72, 73], tačiau, jei komplekso susidarymo metu DNR ar baltymas patiria ženklių konformacinių pakitimų, SK_{teor} gali neatitikti SK_{exp} ir būti net priešingo ženklo [72]. Teigiamą SK_{teor} ar SK_{exp} vertę reiškia, kad didėjant joninei jėgai sąveika su DNR didėja, o neigiama vertė rodo, kad didėjanti joninė jėga silpnina sąveiką su DNR.

Dauguma atvejų nagrinėjant baltymus iš mezofilinių organizmų nuokrypio koeficientai, atitinkantys SK_{teor} ir SK_{exp} , rodo joninės jėgos silp-

ninantį poveikį sąveikai su DNR, t.y. vertės yra neigiamos [68, 72, 74, 75]. Literatūroje pavyko aptikti tik vieną atvejį, kai molekulinio modeliavimo metodais buvo analizuojamas priešingas atvejis [72]. Pastarojoje studijoje buvo nagrinėjami su TATA dėžute sąveikaujantys baltymai ir lyginami mezofiliniai baltymai su baltymu iš halofilinio organizmo *Pyrococcus woesei*. Teigiamą SK_{exp} vertė (2,1) buvo stebima tik baltymo iš šio halofilinio organizmo atveju. Teigiamos SK_{teor} vertės (0,16-0,73) buvo gaunamos tik šio baltymo atveju, tačiau tik su dalimi struktūrų, kurios buvo naudotos modeliavimui. Buvo pademonstruota, kad SK_{teor} ženklas priklauso nuo į skaičiavimus įtraukiamo DNR fragmento dydžio: jam didėjant, įvertis tampa vis labiau teigiamas. Taip pat įdomu pastebėti, kad ir šio halofilinio baltymo sąveikos su DNR atveju polinė solvatacijos energija buvo destabilizuojanti – teigiama (~ 251 kJ/mol).

Taigi baltymo iš halofilinio organizmo atveju, jam sąveikaujant su DNR, gali būti stebima tokia polinės solvatacijos laisvosios energijos dedamosios priklausomybė nuo joninės jėgos, kuri skiriasi nuo tipinės priklausomybės, stebimos baltymų iš mezofilinių organizmų atvejais.

Medžiagos ir metodai

2.1. Prietaisai

Darbui naudoti šie prietaisai: spektrofotometras „NanoDrop ND-1000“ (Thermo Scientific), PGR aparatas „The Verity Thermal Cycler“ (Applied Biosystems), fosforescentinių ekranų blukintojas „Image eraser“ (Amersham Biosciences), fosforescentiniai ekranai „Imaging Plate“ (FujiFilm), skeneris „Typhoon TRIO“ (GE Healthcare) su „Image Quant TL“ programine įranga, gelių džiovintuvas „GD4534“ (SCIE-PLAS), nukleorūgščių elektroforezės aparatai „HU13“ ir „HU20“ (SCIE-PLAS), „DCode“ (Bio-Rad), Ultra-Lum gelių dokumentavimo sistema, baltymų elektroforezės sistema „Mini-PROTEAN® Tetra Cell“ (Bio-Rad), baltyminių gelių ruošimo sistema „Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems“ (Bio-Rad), baltymų pernašos iš gelio ant membranos aparatas „The Mini Trans-Blot Cell“ (Bio-Rad), šlapios baltymo pernašos iš gelio ant membranos rinkinys „The Mini Trans-Blot Cell“ (Bio-Rad), „Synergy 2 Multi-Mode Reader“ fluorimetras (BioTek) su programine įranga „Gen5™ Reader Control and Data Analysis Software“.

2.2. Medžiagos

2.2.1. Reagentai

Naudoti reagentai yra nurodyti 2.1 lent.

2.1 lentelė. Naudoti paruošti reagentai

Gamintojas	Medžiagos
Amresco	CaCl ₂ , glicerolis, glicinas, karbamidas, KH ₂ PO ₄ , MgCl ₂ , NaCl, Na ₂ HPO ₄ , SDS, Tris, Tween 20
AppliChem	Karbenicilinas, imidazolas
Calbiochem	50 % eliugent, KCl
Conda	agaras, mielių ekstraktas, peptonas
Difco	Nugriebto pieno milteliai
Merck	Lizocimas
PAA	BSA milteliais
Perkin Elmer	γ - ³³ P ATP
Roth	100 % acto rūgštis, amonio peroksodisulfatas, druskos rūgštis, etidžio bromidas, izopropanolis, Ratiphorese® Gel30 (37:1), Ratiphorese® Gel40 (29:1), TEMED
Sigma	Gliukozė, 100 % metanolis, Triton X-100
Thermo Fisher Scientific	2 M DTT, 0,5 M EDTA, 100 mM IPTG, 24 % (svoris/tūris) PEG 6000, Top Vision™ agarozė, BCIP/NBT, vanduo be nukleazių
Vilniaus degtinė	96 % etanolis

2.2.2. Buferiniai tirpalai

Visi buferiniai tirpalai ruošiami ir kitos manipuliacijos vykdomos, jei nenurodyta kitaip, naudojant Milli-Q™ vandenį (Milli-Q – Type 1 Ultrapure Water).

Buferiai kompetentinių ląstelių gavimui

„Na“. 5 mM Tris - HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂.

„Ca“. 5 mM Tris - HCl, pH 8,0, 100 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂.

Terpė bakterijų auginimui

LB terpė. 1 % peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl.

Agarizuota LB terpė. 1,5 % agaras, 1 % peptonas, 0,5 % mielių ekstraktas, 0,5 % NaCl.

Baltymų gryninimo tirpalai

Lizės buferis. 0,1 % Triton X-100, 3 mg/ml lizocimo (dedama prieš naudojimą), 50 mM Tris - acetatinis buferinis tirpalas, pH 8, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl₂.

Plovimo buferis. 2 % Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM imidazolo, pH 7,8.

Eliucijos buferis. 2 % Triton X-100, 20 mM Tris - HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 250 mM imidazolo, pH 7,8.

DNazės saugojimo buferis. 50 mM Tris-acetatas, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 50 % glicerolio. Eksperimentuose, kuriuose buvo vertinamas divalenčių metalų poreikis, buferis buvo ruošiamas be CaCl₂.

Tirpalai naudoti aktyvumo matavimuose

Skiedimo buferis. 50 mM Tris - HCl, pH 7,5, 0,5 % Triton X - 100, 0,5 mg/ml BSA, 50 mM CaCl₂. Eksperimentuose, kuriuose buvo vertinamas divalenčių metalų poreikis, buferis buvo ruošiamas be CaCl₂.

Reakcijos buferis naudojant radioaktyvų / nežymėtą substratą (5X). 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM (DNazei I ir jos liejiniams) arba 50 mM (DNazei TA ir jos mutantams) CaCl₂, 12,5 mM (DNazei I ir jos liejiniams) arba 50 mM (DNazei TA ir jos mutantams) MgCl₂. Eksperimentuose, kuriuose buvo vertinamas divalenčių metalų poreikis, buferis buvo ruošiamas be CaCl₂ ir MgCl₂.

Reakcijos buferis naudojant fluorogeninį substratą (5X). 50 mM Tris-HCl, 15 mM EDTA, 5 % Triton X-100, 5 mg/ml BSA.

Startinis tirpalas naudojant fluorogeninį substratą (10X). 40 mM CaCl₂, 100 mM Mg acetato.

Veikimo DNaze buferis gryninant RNR. 22,5 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1,125 M NaCl, 10 mM MnCl₂.

Tirpalai naudoti baltymų elektroforezei

Elektroforezės buferis (Thermo Fisher Scientific). 25 mM Tris, 192 mM glicinas, 0,1% SDS, pH 8,3.

Buferis gelio ruošimui (4X). 1,5 M Tris - HCl, pH 8,8 (frakcionuojančiai daliai) arba pH 6,8 (koncentruojančiai daliai), 0,4 % SDS.

10 % APS.

Gelio fiksavimui. 25 % izopropanolio, 10 % acto rūgšties.

Western Blot tirpalai

Pernašos buferis. 25 mM Tris - HCl, pH 8,3, 192 mM glicino, 10 % metanolio.

PBS buferis. 50 mM Tris - HCl, pH 7,3, 3,2 mM Na₂HPO₄, 0,5 mM KH₂PO₄, 1,3 mM KCl, 135 mM NaCl (pH 7,3).

PBS-T buferis. PBS buferis + 0,1% Tween 20.

Blokavimo tirpalas. PBS buferis su 1 % (svoris/tūris) BSA (milteliais) ir 5 % (svoris/tūris) nugriebto pieno milteliais.

Tirpalai naudoti DNR elektroforezei

TAE (50X) (Thermo Fisher Scientific). 1X buferio sudėtis: 40 mM Tris, 20 mM acto rūgštis, 1 mM EDTA, pH 8,4.

TBE (10X) (Thermo Fisher Scientific). 1X buferio sudėtis: 89 mM Tris, 89 mM boro rūgštis, 2 mM EDTA, pH 8,3.

10 % acto rūgštis. .

Komerciniai rinkiniai / tirpalai

- GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0691).
- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, #K0502).

- aLICator™ LIC Cloning and Expression system (Thermo Fisher Scientific, #K1271).
- 4x DualColor™ Protein Loading Buffer Pack (Thermo Fisher Scientific, #R1011)
- PageBlue™ Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific, #24620)
- 2X RNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, #R0641)
- DNA Loading Dye & SDS Solution (6X) (Thermo Fisher Scientific, #R1151)
- Orange DNA Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific, #R0631)
- ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, #SM1373)
- PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, #26614)

Komerciniai baltymų preparatai

- 2x Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, #F-548S).
- T4 polinukleotidų kinazė (Thermo Fisher Scientific, #EK0031).
- 0,125 mg/ml BSA standartas (Thermo Fisher Scientific, #R1281).
- 20 mg/ml BSA preparatas (Thermo Fisher Scientific, #B14).
- „Monoclonal Anti - polyHistidine - alkaline Phosphatase antibody produced in mouse“ (Sigma).

Komercinės vienkartinės priemonės naudotos baltymų gryninime

- Ni-NTA kolonės (Thermo Fisher Scientific, #88224).
- ElutaTube™ midi (Thermo Fisher Scientific).

Oligonukleotidai

Visų oligonukleotidų sintezė buvo užsakyta Metabion kompanijoje (HPLC švarumo lygmuo). Naudotų pradmenų sekos yra nurodytos 2.2 bei 2.3 lentelėse. Oligonukleotidai, kurie buvo naudoti kaip fluorogeninis substratas aktyvumo matavimams, yra nurodyti skyrelyje 2.3.4.

DNR

- *Bacillus subtilis* 168 chromosominė DNR (koncentracija nežinoma) iš UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ vidinių kolekcijų.
- Laukinio tipo jaučio DNazė I įklonuota į pBR322 tipo plazmidę iš UAB „Thermo Fisher Scientific Baltics“ vidinių kolekcijų.
- pLATE31 vektorius (Thermo Fisher Scientific, #K1261).
- pLATE51 vektorius (Thermo Fisher Scientific, #K1271).
- linearizuota pUC19 DNR (Thermo Fisher Scientific, #SD0401).

2.2.3. Bakteriniai kamienai

***E. coli* ER2267 (New England Biolabs).** Šis kamienas naudotas plazmidinės DNR padauginimui bei klonavimo manipuliacijoms. Genotipas: $F' \text{ proA}+B+ \text{ lacIq } \Delta(\text{lacZ})M15 \text{ zcf}::\text{mini-Tn10 (KanR)} / \Delta(\text{argF-lacZ})U169 \text{ glnV44 e14-(McrA-)} \text{ rfbD1? recA1 relA1? endA1 spoT1? thi-1 } \Delta(\text{mcrC-mrr})114::IS10$.

***E. coli* ER2566 (New England Biolabs).** Šis kamienas naudotas baltymų raiškai. Genotipas: $F- \lambda- \text{ fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 } \Delta(\text{mcrC-mrr})114::IS10 \text{ R(mcr-73::miniTn10-TetS)}2 \text{ R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]}$.

2.3. Metodai

Šiame skyrelyje aprašomi metodai, kurie buvo taikomi atliktame darbe. Taikyti bendrieji metodai, tokie kaip kompetentinių ląstelių gavimas, yra aprašyti paskutiniuose skyreliuose. Visi buferiniai tirpalai ruošiami ir kitos manipulacijos vykdomos, jei nenurodyta kitaip, naudojant Milli-Q™ vandenį (Milli-Q - Type 1 Ultrapure Water).

2.3.1. Bakterinių į DNazę I panašių prokariotinių baltymų sekų analizė ir sąsaja su prokariotų pakantumu druskingumui

Sekų rinkinio sudarymas ir kategorizavimas pagal pakantumą druskingumui

Pradžioje IPR016202 baltymų šeimos sekos buvo paimitos iš InterPro duomenų bazės (2014 m. birželis) [76]. Gauto rinkinio sekų buvo ieškoma UniRef90 grupėse [77] ir vėlesnė analizė atlikta naudojant šių grupių reprezentatyvias sekas. Visos ne prokariotų sekos buvo pašalintos. Likusios sekos buvo naudojamos filogenetinėje analizėje bei baltymų duomenų aptikimui. Remiantis InterPro duomenimis buvo sudarytas sekas atitinkančių mikroorganizmų sąrašas ir buvo siekiama suskirstyti šiuos mikroorganizmus pagal maksimalią NaCl koncentraciją (M), kurioje vis dar vyksta jų augimas.

Baltymų domenų detekcija

Domenai bakterinių DNazių sekose buvo aptikti naudojant InterProScan 5.4-47.0 [78] programą. Atitinkamų sekų filogenijos analizė buvo atliekama naudojant Phyrn 1.7.2 programinį paketą [79]. 5000 atstumo matricų replikos buvo naudotos savirankos (angl. *bootstrap*) analizėje. Atitinkami kaimynų sujungimo (angl. *neighbour-joining*) medžiai apskaičiuoti ir vidutinis medis gautas naudojant NEIGHBOR ir CONSENS programas iš PHYLIP paketo [80]. ETE 2.2 programinis paketas buvo naudojamas vidutinio medžio ir papildomos informacijos vizualizacijai [81].

Sekrecijos signalinės sekos detekcija

Sekrecijos signalinės sekos paieška buvo atlikta tų DNazių sekose, kurios yra iš organizmų, galinčių augti esant 1,5 M arba didesnėms NaCl koncentracijoms. Sekrecijos signalinės sekos buvo ieškoma naudojant tris programas: 1) SignalIP 4.1 [82] buvo naudojamas gramneigiamų bakterijų sekoms, 2) PRED-SIGNAL [83] buvo naudojamas archėjinei sekai (*Methanohalobium evestigatum*), 3) Philius [84] buvo naudojamas prognozuoti baltymo tipą kartu su sekrecijos signalinės sekos buvimu.

2.3.2. Rekombinantinių baltymų producentų gavimas

DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* klonavimas bei jos mutantų konstravimas bei klonavimas

DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* (DNazė TA) geno DNR buvo užsakyta iš DNA 2.0 kompanijos, kodonai sekoje buvo optimizuoti ekspresijai *E. coli*. Baltymo seka atitiko UniProt įrašą (prieigos kodas D3SGB1) atmetus sekrecijos signalą atitinkantį sekos fragmentą. DNR klonavimui buvo padauginta naudojant pradmenų porą, nurodytą 2.2 lent. PGR atlikta naudojant 2x Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix. Genas buvo klonuotas į pLATE31 vektorių. C-galinio His₆-žymens koduojanti seka buvo vektoriuje ir prijungta prie geno klonavimo metu.

Buvo sukurti du šios His₆-žymeniu pažymėtos DNazės TA mutantai:
i) DNazinio domeno aktyvaus centro mutantas (H134A [7]), kuris toliau

2.2 lentelė. Oligonukleotidų sekos, kurios buvo naudojamos konstruojant DNazės TA bei jos mutantų producentus

DNazės TA mutantas	PGR žingsnis	Seka
DNazė TA H134A	1	GCCGCCACGTTGCAATCACCTACGG
	2	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGGCTCGATGCAGGCCTCAC AGAAGGAGATATAACTATGCTGCGCCTGGCAAGCTGG
DNazė TA Δ C	1	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCACCTTCGAACAGTACA TAAACCGG AGAAGGAGATATAACTATGCTGCGCCTGGCAAGC
DNazė TA	1	GTGGTGGTGATGGTGATGGCCCGGCTCGATGCAGGCCTCAC AGAAGGAGATATAACTATGCTGCGCCTGGCAAGCTGG

žymimas kaip DNazė TA H134A, ii) mutantas su pašalintu C-galiniu domenu, kuris toliau žymimas kaip DNazė TA ΔC . DNazės TA H134A DNR klonavimui buvo padauginta dviejų žingsnių megapradmenų PGR. Mutanto DNazė TA ΔC DNR klonavimui buvo padauginta per vieną PGR žingsnį. Abu mutantai buvo klonuoti į pLATE31 vektorių, kuriame buvo klonavimo metu prijungto C-galinio His₆-žymens koduojanti seka. Klonavimui reikalingos PGR reakcijos atliktos naudojant 2x Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix.

Tikslinės DNazės TA bei jos mutantų sekos, kurias buvo siekiama sukurti klonavimo metu, yra pateiktos 2.1 pav.

Naudotos pradmenų sekos yra pateiktos 2.2 lent. Prieš klonavimą gauti DNR fragmentai buvo gryninti iš 1 % agarozinio gelio naudojant GeneJET™ Gel Extraction Kit.

DNR konstruktai gauti bei padauginti naudojant *E.coli* ER2267 kamieną. Bakterijos po transformacijos buvo auginamos ant LB agarizuotos terpės su gliukoze (2 % (svoris/tūris)) bei karbenicilinu (50 µg/ml). Plazmidžių gryninimui bakterijos buvo auginamos skystoje LB terpėje su tokiomis pačiais priedais. Plazmidės grynintos naudojant GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit.

DNazėTA	ATGCTGCGCCTGGCAAGCTGGAACATCCAGCACCTGGGCTGGAACGTCGGTAAGGACTAC
DNazėTA H134A	ATGCTGCGCCTGGCAAGCTGGAACATCCAGCACCTGGGCTGGAACGTCGGTAAGGACTAC
DNazėTA ΔC	ATGCTGCGCCTGGCAAGCTGGAACATCCAGCACCTGGGCTGGAACGTCGGTAAGGACTAC
DNazėTA	CCGGCCGTCGCACGCATCGCGCGCAGTTCGACTTCTGGCGATCCAAGAAGTCATGAAC
DNazėTA H134A	CCGGCCGTCGCACGCATCGCGCGCAGTTCGACTTCTGGCGATCCAAGAAGTCATGAAC
DNazėTA ΔC	CCGGCCGTCGCACGCATCGCGCGCAGTTCGACTTCTGGCGATCCAAGAAGTCATGAAC
DNazėTA	GCCGAGGGTATTTACCGCCTGCGTGACACCTGGAAGACGCGACCGGTGCCGAGTGGTCC
DNazėTA H134A	GCCGAGGGTATTTACCGCCTGCGTGACACCTGGAAGACGCGACCGGTGCCGAGTGGTCC
DNazėTA ΔC	GCCGAGGGTATTTACCGCCTGCGTGACACCTGGAAGACGCGACCGGTGCCGAGTGGTCC
DNazėTA	GTTCGTACTCCGACGCGCTGGGCCGCAACACCTATCGTGAAAAGTACGCGTTCCTGTGG
DNazėTA H134A	GTTCGTACTCCGACGCGCTGGGCCGCAACACCTATCGTGAAAAGTACGCGTTCCTGTGG
DNazėTA ΔC	GTTCGTACTCCGACGCGCTGGGCCGCAACACCTATCGTGAAAAGTACGCGTTCCTGTGG
DNazėTA	CGTGAGGCCGAGTTGAGTATGTCGGTGGTGGCTGACCTACATCGACGAGGCCGACCGT
DNazėTA H134A	CGTGAGGCCGAGTTGAGTATGTCGGTGGTGGCTGACCTACATCGACGAGGCCGACCGT
DNazėTA ΔC	CGTGAGGCCGAGTTGAGTATGTCGGTGGTGGCTGACCTACATCGACGAGGCCGACCGT
DNazėTA	TTTGCCCGTGAGCCGTTCTCCGCGTCTTTTCGTTCCCGTGGCACGGATCAGCATTTCCCTG
DNazėTA H134A	TTTGCCCGTGAGCCGTTCTCCGCGTCTTTTCGTTCCCGTGGCACGGATCAGCATTTCCCTG
DNazėTA ΔC	TTTGCCCGTGAGCCGTTCTCCGCGTCTTTTCGTTCCCGTGGCACGGATCAGCATTTCCCTG
DNazėTA	GCCGCCACGGTTCACATCACCTACGGCGACCGTGTTCGGGATCGTGTGAGGAGATCGAG
DNazėTA H134A	GCCGCCACGGTTCACATCACCTACGGCGACCGTGTTCGGGATCGTGTGAGGAGATCGAG
DNazėTA ΔC	GCCGCCACGGTTCACATCACCTACGGCGACCGTGTTCGGGATCGTGTGAGGAGATCGAG
DNazėTA	GCATGCGTCTTACTGGGACTGGCTGGCGGACGTCATGCCGGAGTACGCGCGCAACGC
DNazėTA H134A	GCATGCGTCTTACTGGGACTGGCTGGCGGACGTCATGCCGGAGTACGCGCGCAACGC
DNazėTA ΔC	GCATGCGTCTTACTGGGACTGGCTGGCGGACGTCATGCCGGAGTACGCGCGCAACGC
DNazėTA	ATCCTGTTCCGGCAGCTTCAATCTGCCCGCCACCACGACGGTTGGCCCTCGATGCGTGGC
DNazėTA H134A	ATCCTGTTCCGGCAGCTTCAATCTGCCCGCCACCACGACGGTTGGCCCTCGATGCGTGGC
DNazėTA ΔC	ATCCTGTTCCGGCAGCTTCAATCTGCCCGCCACCACGACGGTTGGCCCTCGATGCGTGGC
DNazėTA	GTTGCCGAACCGTGGTCAACGAGGGCGCCACCACCTGTCCACGCATGACCGTCCGTAC
DNazėTA H134A	GTTGCCGAACCGTGGTCAACGAGGGCGCCACCACCTGTCCACGCATGACCGTCCGTAC
DNazėTA ΔC	GTTGCCGAACCGTGGTCAACGAGGGCGCCACCACCTGTCCACGCATGACCGTCCGTAC
DNazėTA	GCGAATCTGTACGACAATCTGTGGTTCGGAAGGATCACACGCTGCCGCTGGGTGATGCC
DNazėTA H134A	GCGAATCTGTACGACAATCTGTGGTTCGGAAGGATCACACGCTGCCGCTGGGTGATGCC
DNazėTA ΔC	GCGAATCTGTACGACAATCTGTGGTTCGGAAGGATCACACGCTGCCGCTGGGTGATGCC
DNazėTA	GGCATCTGCCGTTCCCGGTCGTTCTGAGTGAGGTAACCGGTGTCTACTGGATCACGAA
DNazėTA H134A	GGCATCTGCCGTTCCCGGTCGTTCTGAGTGAGGTAACCGGTGTCTACTGGATCACGAA
DNazėTA ΔC	GGCATCTGCCGTTCCCGGTCGTTCTGAGTGAGGTAACCGGTGTCTACTGGATCACGAA
DNazėTA	AAGGCCCGCAGCCGTCTCCGACCATGCCCGGTTTATGTACTGTTGCAAGGTAACACG
DNazėTA H134A	AAGGCCCGCAGCCGTCTCCGACCATGCCCGGTTTATGTACTGTTGCAAGGTAACACG
DNazėTA ΔC	AAGGCCCGCAGCCGTCTCCGACCATGCCCGGTTTATGTACTGTTGCAAGGTAACACG
DNazėTA	CTGCACGACGCGTGTGTCGCGGAGATCGCCGATCAAGAAGCGGGTGCATCGATCTGAAT
DNazėTA H134A	CTGCACGACGCGTGTGTCGCGGAGATCGCCGATCAAGAAGCGGGTGCATCGATCTGAAT
DNazėTA ΔC	-----
DNazėTA	CGCGCCTCGGTAAGCGAACTGACCGCCTGCCGCATATTGGCGAGGCACGTGCCGAGGGC
DNazėTA H134A	CGCGCCTCGGTAAGCGAACTGACCGCCTGCCGCATATTGGCGAGGCACGTGCCGAGGGC
DNazėTA ΔC	-----
DNazėTA	ATCAAGGACGGTCCGTCGGAATGCCGTTTCGTCGACCTGAAAAGAGATTCGCGGTATCGGT
DNazėTA H134A	ATCAAGGACGGTCCGTCGGAATGCCGTTTCGTCGACCTGAAAAGAGATTCGCGGTATCGGT
DNazėTA ΔC	-----
DNazėTA	GCTGGTCTGTCGGAGGAGATCAAGGCGGTGGTGGGCGCTGCATCGAGCCGGCCATCAC
DNazėTA H134A	GCTGGTCTGTCGGAGGAGATCAAGGCGGTGGTGGGCGCTGCATCGAGCCGGCCATCAC
DNazėTA ΔC	-----GGCCATCAC
DNazėTA	CATCACCACCACGGCTAA
DNazėTA H134A	CATCACCACCACGGCTAA
DNazėTA ΔC	CATCACCACCACGGCTAA

2.1 pav. Klonojamos DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* bei jos mutantų koduojančios sekos. Raudona spalva žymi DNazės domeno aktyviojo centro inaktyvuojančios mutacijos sritį (DNazė TA H134A). Žydra spalva žymi C-galinę dalį su His₆ žymeniu. „---“ žymi sritį, kuri pašalinta mutante DNazė TA Δ C.

Jaučio DNazės I bei jos liejinių konstravimas ir klonavimas

Subrendusios (be sekrecijos signalo) laukinio tipo jaučio DNazės I koduojanti DNR buvo klonuota į vektorių pLATE51 (NCBI referentinė seka NM_174534.2) naudojant rinkinį aLICator™ LIC Cloning and Expression system. Klonavimo metu buvo prijungta vektoriuje esanti N-galinio

2.3. Metodai

2.3 lentelė. Pradmenys, kurie buvo naudojami klonuojant jaučio DNazės I geną bei konstruojant jos liejinius koduojančius genus

Fermentas	PGR žingsnis	Pradmens seka
DNazė DT	1	CGGTGGAGGTGACGCTGACAGGTAACACGCTGCACGACGC GGAGATGGGAAGTCATTACTCGATGCAGGCCTCACCAC
	2	GGTGATGATGATGACAAGCTGAAGATAGCAGCCTTCAACATCCG
DNazė BS	1	CGGTGGAGGTGACGCTGACAGGAGAGGAAACAGCAGTGCAGC GGAGATGGGAAGTCATTACTTTACTGTAATGGAAGACTTTATTTTCTCA
	2	GGTGATGATGATGACAAGCTGAAGATAGCAGCCTTCAACATCCG
DNazė I	1	GGAGATGGGAAGTCCTTATGTCAGCGTCACCTCCACC GGTGATGATGATGACAAGCTGAAGATAGCAGCCTTCAAC

His₆-žymens ir trumpo saito koduojanti seka. Pradmenų sekos vienam reikalingam PGR žingsniui yra pateiktos 2.3 lent.

Buvo sukurti du liejiniai prie jaučio DNazės C-galo prijungiant šiuos domenų:

1. C-galinį domeną iš DNazės TA (*Thioalkalivibrio sp. K90mix*). Šis domenų toliau žymimas DT, o liejinys – DNazė DT.
2. ComEA baltymo C-galinis domenų (*Bacillus subtilis*). Šis domenų toliau žymimas BS, o liejinys – DNazė BS.

DNR fragmentai klonavimui abiemis liejiniamis buvo gauti dviejų žingsnių megapradmenų PGR būdu. Naudotos pradmenų sekos yra pateiktos 2.3 lent. PGR produktai buvo klonuoti į pLATE51 vektorių naudojant aLICator™ LIC Cloning and Expression system. Klonavimo metu buvo prijungta vektoriuje esanti N-galinio His₆-žymens ir trumpo saito koduojanti seka.

Plazmidė, turinti DNazė TA seką (žr. ankstesnį skyrelį), buvo naudota kaip matricinė DNR vykdant 1-ąjį PGR žingsnį konstruojant DNazę DT. Tuo tarpu konstruojant DNazę BS kaip matricinė DNR vykdant 1-ąjį PGR žingsnį buvo naudojama *Bacillus subtilis subsp. subtilis str. 168* (ATCC 23857) genomine DNR.

PGR reakcijos atliktos naudojant 2x Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix. Gauti DNR fragmentai gryninti iš 1 % agarozinio gėlio naudojant GeneJET™ Gel Extraction Kit. DNR konstrukcijos gautos

bei padaugintos naudojant *E.coli* ER2267 kamieną. Bakterijos po transformacijos buvo auginamos ant agarizuotos LB terpės su gliukoze (2 % (svoris/tūris)) bei karbenicilinu (50 µg/ml). Plazmidžių gryninimui bakterijos buvo auginamos LB terpėje su tokiais pačiais priedais. Plazmidės grynintos naudojant GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit.

2.3.3. Baltymų raiška ir gryninimas

Ekspresija

Baltymų ekspresijai sukonstruotomis rekombinantinėmis plazmidėmis buvo transformuojamas *E.coli* ER2566 kamienas. Bakterijos buvo auginamos LB terpėje, papildytoje 1 % (svoris/tūris) gliukozės bei karbenicilinu (50 µg/ml). Užsėjus vieną koloniją inokuliatas (angl. *pre-culture*) buvo auginamas iki OD₆₀₀ 0,3 37 °C temperatūroje ir tuojau pat naudojamas pagrindinei kultūrai užsėti (1/40 pagrindinės kultūros tūrio). Iki indukcijos pagrindinė kultūra buvo auginama 37 °C temperatūroje. Baltymo ekspresija buvo indukuojama pridedant IPTG (1 mM), kai OD₆₀₀ pasiekdavo 0,8-0,9. Prieš indukciją kultūra būdavo atšaldoma ledų vonioje (10 min) ir vėliau auginama 16 val. 23 °C temperatūroje.

Gryninimas

Gryninant baltymus buvo naudojama cheminė lizė ir vieno žingsnio gryninimas su afininės chromatografijos (Ni-NTA) kolonėlėmis.

Lizė buvo atliekama resuspenduojant biomasę (gautą iš 100 ml) 2,4 ml lizės buferio ir paliekama 30 min. kambario temperatūroje. Po to užpilama 2,4 ml plovimo buferio (2X) ir 15-30 min. paliekama 4 °C. Visos kitos manipuliacijos atliekamos stengiantis preparatus laikyti ledų vonioje ir naudojant iki 0 °C atšaldytą centrifugą.

Po lizės centrifuguojama (10 min. 12000 x g) ir supernatantas nešamas ant kolonėlės, kuri buvo prieš tai buvo praplauta 600 µl plovimo buferiu (centrifuguojant 2 min. 700 x g). Supernatantas nešamas per kelis kartus

po ~500 µl dalimis, po kiekvienos porcijos centrifuguojant 5 min. 200-300 x g. Po užnešimo plaunama du kartus po 600 µl plovimo buferiu, centrifuguojant 2 min. 700 x g. Eliucija vykdoma per du plovimus naudojant po 200 µl eliucijos buferio.

Eliuatai buvo dializuojami per naktį (~16 val.) prieš saugojimo buferį (eliuato ir buferio tūrių santykis 1:200.) naudojant ElutaTube™ midi.

Tikslinių baltymų detekcija ir koncentracijų nustatymas

Tikslinio baltymo koncentracijos buvo nustatomos vykdant SDS-PAGE ir gautų elektroforegramų densitometriją. Kaip standartai buvo naudojami žinomų koncentracijų jaučio serumo albumino (BSA) mėginiai. BSA kalibraciniai mėginiai buvo gauti saugojimo buferiu skiedžiant 0,125 mg/ml BSA standartą 1, 2, 4, 8, 16, 32 kartus. Kaip molekulinio svorio standartas buvo naudojamas PageRuler™ Unstained Protein Ladder.

Western Blot analizė buvo naudojama įvertinti tikslinių baltymų (tūrinčių His₆-žymenį) pasiskirstymą tirpioje ir netirpioje lizato frakcijose. Pernaša po SDS-PAGE buvo atliekama ant PVDF membranos. Žymens atpažinimui buvo naudoti His₆ specifiniai antikūniai, konjuguoti su šarmi-ne fosfataze.

2.3.4. DNazinio aktyvumo vertinimas

Aktyvumo vertinimas buvo atliekamas stebint kelių DNR substratų hidrolizę: vieno ilgo DNR substrato bei dviejų trumpų. Norėta patikrinti, ar tos pačios tendencijos stebimos naudojant skirtingo ilgio DNR substratus. Ilgas substratas buvo nežymėtas. Vienas trumpas substratas buvo pažymėtas radioaktyvia, o kitas – fluorescencine žyme. Žemiau pateikiamos detalės.

Ilgo nežymėto dvigrandės DNR fragmento hidrolizė

2 µg linearizuotos pUC19 DNR buvo hidrolizuojama naudojant 2,5 nM tiriamos nukleazės. Buvo tirti du NaCl koncentracijų intervalai: 0 – 1 M su 0,1 M žingsniu ir 0 – 4 M su 0,4 M žingsniu. Reakcijos buvo atliekamos 10 min. 37 °C temperatūroje 100 µl reakcijos tūryje. Reakcijos buferio sudėtis: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM (DNazei I ir jos liejiniams) arba 10 mM (DNazei TA ir jos mutantams) CaCl₂, 2,5 mM (DNazei I ir jos liejiniams) arba 10 mM (DNazei TA ir jos mutantams) MgCl₂. Eksperimente, kuriame buvo tiriami divalenčių metalo jonų poreikiai, buvo naudojamos ir kitokios MgCl₂ bei CaCl₂ druskų koncentracijos – jos pateikiamos kartu su atitinkamais rezultatais.

Reakcijos produktai buvo analizuojami vykdant elektroforezę 1 % agarozės gelyje 1x TAE buferyje su etidžio bromidu. ZipRuler™ Express DNA Ladder 2 iš ZipRuler™ Express DNA Ladder Set, ready-to-use buvo naudojamas kaip dydžio standartas vertinant gautų DNR hidrolizės produktų ilgį.

Trumpo radioaktyvaus DNR duplexo hidrolizės analizė

Dvigrandės DNR substratas gautas hibridizuojant du oligonukleotidus:

- 5'-AATAATGCGCTAATAA-3',
- 5'-TTATTAGCGCATTATT-3'.

Hibridizacija vykdyta esant šių oligonukleotidų koncentracijoms santykiu 1:1,1 (verdančio vandens vonioje paliekant atvėsti iki kambario temperatūros). Pirmasis iš šių oligonukleotidų buvo pažymėtas ³³P naudojant T4 polinukleotidų kinazę remiantis gamintojų rekomendacijomis. Rekomenduojamas protokolas buvo modifikuotas: reakcijos buferyje buvo 4,8 % (svoris/tūris) PEG 6000 ir nebuvo pašalintas neįjungtas γ -³³P ATP.

10 nM 16 bp dvigrandžio substrato (2 nM buvo pažymėti su ^{33}P 5' gale) buvo karpomi su 0,66 nmol tiriamo fermento 37 °C temperatūroje 100 µl reakcijos tūryje. Reakcijos buvo vykdomos į reakcijos buferį pridedant NaCl iki 0, 0,5, 1,2, 4 M. Po 9 µl mėginių iš reakcijos mišinio buvo paimta praėjus 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 192 minutėms po reakcijos pradžios. Mėginiai iš karto po paėmimo buvo sumaišyti su 9 µl 2X RNR loading Dye, pakaitinti 5 min. 95 °C temperatūroje ir vėliau analizuoti denatūruojančia PAGE. Substrato karpymo puslaikis buvo nustatomas atliekant atitinkamo fragmento densitometrinę analizę: substrato mažėjimas kiekybiškai įvertintas naudojant TotalLabQuant programinę įrangą, o atitinkami hidrolizės puslaikiai buvo apskaičiuoti naudojant GraphPad Prism programine įranga.

Trumpo fluoroforu žymėto DNR duplekso hidrolizės analizė

DNazės I bei jos liejinių DNR aktyvumas esant sąlygiškai mažoms NaCl koncentracijoms (0, 50, 100 mM) buvo analizuotas stebint fluorogeninio 30 bp DNR duplekso hidrolizę. Dupleksas gautas hibridizuojant šiuos oligonukleotidus:

- 5'-GTTGGTGGGTTTGGGTGTGGGTTTGTGTTT-BHQ1-3'
- 5'-FAM-AAACACAAACCCACACCCAAACCCACCAAC-3'

Reakcijos buvo vykdomos šios sudėties buferyje: 10 mM Tris-HCl, 3 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 1 mg/ml BSA, 0,2 µM DNR duplekso bei 0,044 nM tiriamos nukleazės. Reakcijos buvo pradamos 10X startiniu tirpalu (40 mM CaCl_2 ir 100 mM Mg acetato). Prieš pradedant fluorescencijos matavimą 25 µl šio tirpalo buvo pridedama prie 225 µl paruošto reakcijos mišinio. Fluorescencija buvo matuojama kas 12 sekundžių 10 min. ir pagal kiekvieną gautą kreivę buvo apskaičiuojamas maksimalus fluorescencijos kitimo greitis, kuris yra proporcingas enzimatiniam aktyvumui. Reakcijos mišiniai buvo paruošti ir matavimai atlikti kambario

temperatūroje (~ 23 °C). Tokie eksperimentai buvo atliekami keičiant galutinę NaCl koncentraciją reakcijos mišinyje (0, 50, 100 mM) siekiant įvertinti fermentinio aktyvumo slopinimą didėjant druskos koncentracijai.

2.3.5. DNazės TA DNazinio domeno struktūros modeliavimas ir analizė

DNazės TA baltymo seka buvo paimta iš Uniprot [77] įrašo (prieigos kodas D3SGB1). Programa HHblits [85] iš paketo HH-suite 2.0 buvo panaudota baltymų domenų detekcijai. DNazinio domeno trimatė struktūra buvo modeliuojama naudojant I-Tasser serverį [86]. Gautas modelis buvo optimizuotas ir patikslintas naudojant programą Kobamin. [87]. Elektrostatinis paviršiaus potencialas buvo analizuotas su programiniu paketu APBS tools 1.4.0 [61] ir vizualizuotas su programa Pymol [88]. Elektrostatiniam skaičiavimams struktūra buvo paruošta naudojant programą PDB2PQR [89] pagal Amber jėgų lauką [90]. Elektrostatinio potencialo intervalas nuo -5 kT/e (raudona) iki $+5$ kT/e (mėlyna) buvo parinktas paviršiaus spalvoms perteikiant elektrostatinio potencialo intensyvumą. Analogiškai buvo analizuota ir DNazino domeno struktūra iš *Methanohalobium evestigatum*.

Vertinant paviršinių aminorūgščių variabilumą DNazės TA homologai buvo identifikuoti naudojant programą PSI-Blast [91] ir programą Jackhammer [92]. Surinktų homologinių baltymų sekų daugybinis palyginys buvo gautas naudojant programą MAFFT [93] su L-INS-i [94] algoritmu. Gautas daugybinis palyginys toliau buvo analizuotas su programa ConSurf [95] identifikuojant konservatyvias aminorūgštis.

Siekiant identifikuoti aminorūgštis, galimai sąveikaujančias su DNR ar metalo jonais, DNazės TA sumodeliuota struktūra buvo perklotą su šiomis DNazės I struktūromis iš PDB (pateikiami PDB ID numeriai): 4AWN, 2A3Z, 3DNI (nustatytos divalenčių jonų pozicijos), 1DNK (kompleksas su DNR). Struktūrų perklojimas buvo atliktas naudojant Dali server [96]

tinklapi (prieiga 2014 m. gruodžio mėn.) ir susietas su sekomis naudojant programą Jalview 2.8.2 [97].

2.3.6. DNazės TA DNR rišančio domeno filogenezė

Sekų analizei surinkimas

Buvo siekiama išsiaiškinti DNR rišančio motyvo iš DNazės TA kilmę. Pradžioje buvo surinktos sekos, atitinkančios bakterinius baltymus, kurie sudaryti iš į DNazę panašaus domeno (EEP superšeima, CDD v3.12 [98]) ir DNR rišančio domeno, turinčio dvigubą HhH motyvą (H3TH_StructSpec-5'-nucleases superšeima, CDD v3.12 [98]). Šių sekų fragmentai, atitinkantys dvigubo HhH motyvo domeną, buvo išskirti ir pagal atitinkamas sekas buvo sudarytas paslėptasis Markovo modelis (PMM) naudojant HMMER v3.1b1 programinį paketą [99]. Pagal šį modelį buvo atlikta paieška UniProtKB [77] duomenų bazėje per HMM webserver [100] tinklapi (prieiga 2014 m. gruodžio mėn.). Bakterinės sekos, kurios patikimai atitiko PMM (e įvertis mažesnis nei 10^{-13}), buvo suklastertizuotos pagal identiškumą (70 % sekos identiškumo lygmuo) naudojant CD-HIT programinį paketą [101, 102] ir tolesnei analizei buvo naudotos klasterių reprezentacinės sekos. Identiškumo lygmuo, naudotas klasterizavimui, bei e įvertis, naudotas sekų paieškoje, buvo parinkti siekiant gauti ~ 100 sekų tolimesnei analizei. Šis sekų rinkinys buvo papildytas vienu baltymu iš kininio žiurkėno *Cricetulus griseus* (UniProt prieigos kodas G3HTJ3), kuris yra sudarytas iš vieno į DNazę panašaus domeno ir dviejų dvigubą HhH motyvą turinčių domenų. Šis baltymas buvo panaudotas filogenetinei analizei kaip šalutinės grupės (angl. *outgroup*) baltymas šaknies pozicijos parinkimui.

Filogenetinio medžio konstravimas

Filogenetinis medis buvo kuriamas pagal tik tuos gauto rinkinio sekų fragmentus, kurie atitiko PMM (žr. aukščiau). Šie fragmentai buvo suly-

ginti naudojant PROMALS3D tinklapį [103,104] (prieiga 2014 m. gruodžio mėn.). Remiantis gautu daugybiniu sekų palyginiu buvo sukonstruotas filogenetinis medis naudojant RAxML 8.1.22 programa [105]. Aminorūgščių kaitos modelis buvo parinktas automatiškai naudojant maksimalios tikimybės (MT) kriterijų. Konstruojant medį pirmiausiai buvo atliekama savirankos paieška (angl. *bootstrap search*) naudojant išplėstinį daugumos nulemtą konsensuso medį (angl. *extended majority-rule consensus tree*) kriterijų. Po šio etapo buvo atliekama MT medžio paieška. Rastas maksimalios tikimybės medis buvo naudojamas tolimesnėje analizėje.

Filogenetinio medžio anotavimas

Duomenų bazė CDD v3.12 [98] buvo naudota ieškant sekose atitikimų baltymų domenų superšeimoms arba atitikimų kelis domenus apimantiems (angl. *multidomain hits*) domeninės struktūros tipams. Paieška buvo atliekama pilno ilgio sekose – tuo tarpu filogenetinis medis buvo sudarytas tik pagal sekos fragmentus atitinkančius dvigubo HhH motyvo domeną. ETE 2.2 programinis paketas [81] buvo naudotas filogenetinio medžio vizualizacijai bei rastų atitikmenų CDD v3.12 [98] pavaizdavimui. Medžio šaknies pozicija buvo parinkta remiantis baltymu iš eukarioto (*Cricetulus griseus*).

2.3.7. DNR rišančių domenų molekulinis modeliavimas

Homologinis struktūrų modeliavimas

Domenų BS (iš *Bacillus subtilis*) ir DT (iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*) erdvinės struktūros buvo sumodeliuotos naudojant I-Tasser 3.0 programą [86] ir geriausi modeliai (C-įverčio aspektu) buvo panaudoti tolimesnei analizei. Dvi sekos, pažymėtos žaliu rėmeliu 3.7 pav., buvo modeliavimo taikiniai. Gautuose modeliuose žemos kokybės N-galiniai nestruktūrizuoti fragmentai (tarpdomeninė sritis) buvo pašalinti remiantis tikėtinu modelio tikslumu, pateikiamu kiekvienai sekos pozicijai (I-Tasser 3.0 išvestis). N-

galinės ir C-galinės sritys buvo papildomai „apkarpytos“ siekiant pašalinti tas nestruktūrizuotas galines vijas, kurios nesutapatinamos perklojant BS ir DT struktūras. Struktūrų perklojimas, vizualinis vertinimas bei fragmentų pašalinimas buvo atliekamas naudojant Pymol programą [88].

Domenų – DNR kompleksų modeliavimas

Sumodeliuotos dviejų domenų struktūros buvo perklotos (naudojant MultiProt 1.6 [106]) su homologiniu domenu iš kristalografinės struktūros PDB ID: 3E0D [107] (vienas iš šablonų naudotų homologiniame modeliavime) ir 19 bp ilgio dvigrandė DNR iš šios kristalografinės struktūros, kuri po perklojimo atsidūrė greta DT bei BS struktūrų, buvo „iškirpta“ iš kristalografinės struktūros. DNR geometrija buvo optimizuota naudojant 3D-DART tinklapį [108] (prieiga 2014 m. gruodžio mėn.). Tuomet ši DNR buvo kompleksuota (angl. *docked*) su domenų struktūromis naudojant HADDOCK tinklapį (prieiga 2014 m. gruodžio mėn.) per „Refinement“ sąsają [109]. Gautos struktūros buvo panaudotos elektrostatiniams skaičiavimams.

Elektrostatiniai skaičiavimai

Du sumodeliuoti baltymo-DNR kompleksai buvo perkloti naudojant Pymol [88] ir analizuoti su APBS tools 1.4.0 elektrostatinių skaičiavimų programiniu paketu [61]. Rezultatai buvo vizualizuoti su Pymol [88]. Struktūros buvo paruoštos elektrostatiniams skaičiavimams su PDB2PQR 2.0.0 [89] programa taikant Amber jėgų lauką [90]. APBS programinis paketas buvo naudotas prognozuojant galimą laisvosios energijos pokytį (polinės solvatacijos dedamąją), kuris susidaro baltymo-DNR sąveikos metu. Skaičiavimams buvo naudota netiesinė Poisson-Boltzmann lygtis, visi kiti skaičiavimų parametrai buvo savaiminės parinktės. Skaičiavimai buvo atlikti analogiškai skaičiavimams analizuojant RNR-baltymo sąveiką [73]. APBS išvesties failai (tankio žemėlapiai) buvo panaudoti analizuojant ir vaizduojant galimą lokalų jonų koncentracijos bei krūvio pasiskirstymo

pokytį, įvykusį formuojantis DNR bei DT ir BS kompleksams. Tai buvo atlikta naudojant pagalbines programas iš APBS programinio paketo.

2.3.8. Naudoti standartiniai eksperimentiniai metodai

Kompetentinių ląstelių gavimas

5 ml LB terpės aseptiškai inokuliuojami reikiamu *E. coli* kamieniu ir inkubuojami 37 °C purtant (~200 aps./min) tol, kol OD₆₀₀ pasiekdavo ~0,5. Kultūra atšaldoma (~5 min) ledo vonioje ir visos kitos manipuliacijos atliekamos stengiantis kuo trumpiau laikyti ne ledo vonioje bei naudojant iš anksto atšaldytus iki 0 °C „Ca“ bei „Na“ tirpalus. Taigi po kultūros atšaldymo ląstelės surenkamos centrifuguojant (10 min, 1200 x g) atšaldytoje iki 0 °C centrifugoje. Nupylus supernatantą ląstelės suspenduojamos pusėje pradinio tūrio „Na“ tirpalo ir pakartotinai centrifuguojamos tomis pačiomis sąlygomis. Nupylus supernatantą ląstelės suspenduojamos pusėje pradinio tūrio Ca tirpalo inkubuojamos 15-30 min. ledo vonioje. Po to vėl centrifuguojama tomis pačiomis sąlygomis. Nupylus supernatantą ląstelės suspenduojamos ~1/20 pradinio tūrio „Ca“ tirpalo ir naudojamos transformacijai.

Transformacija

1 µl DNR preparato pridedama prie ~50 µl paruoštų kompetentinių ląstelių. Mišinys ~10 min. inkubuojamas ledo vonioje. Po to lygiai 1 min. pernešamas į vandeninį termostatą (42 °C). Iš karto po to skiedžiama (37 °C) temperatūros LB terpe (papildyta 1 % (svoris/tūris) gliukozės) santykiu 1:100. Inkubuojama 30 min. 37 °C temp. vandens vonioje. Po inkubacijos ~200 µl transformacijos mišinio išsėjama ant agarizuotos mitybinės terpės. Lėkštelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje ~16 val.

DNR denatūruojanti elektroforezė

Paruošiama ir užpildoma 15 % poliakrilamidinio gelio mišiniu gelio ruošimo forma bei įstatomos šukos. Vieno gelio mišinio (30 ml) sudėtis: 11,25 ml Ratiphorese® Gel40 (29:1), 3 ml TBE buferio (10X), 12,6 g karbamido ir vandens iki reikiamo tūrio. Prieš pat pylimą pridedama 300 µl 10 % APS ir 25 µl TEMED. Polimerizacija vykdoma 20 - 30 min. Pagal gamintojo rekomendacijas paruošiamas vertikalus elektroforezės aparatas DCode (Bio-Rad). Elektroforezė vykdoma 1x TBE buferiniame tirpale. Parengiamoji elektroforezė vykdoma esant 600V įtampai, kol aparate esančių buferinių tirpalų temperatūra pasiekia 50 °C temp. Tuomet nešama po 3 µl paruošto mėginio. Toliau elektroforezė vykdoma esant 600 V įtampai. Po elektroforezės gelis fiksuojamas 10 % acto rūgšties tirpale (~15 min), praplaunamas dejonizuotu vandeniu (~5 min) ir džiovinamas (~1 val.) Po to gelis eksponuojamas ant fosforescentinio ekrano 10-14 val (prieš tai ekranas išblukinamas). Ekranas skenuojamas su Typhoon TRIO skaitytuvu.

DNR elektroforezė

Agarozės gelis ruošiamas ir elektroforezė vykdoma naudojant TAE buferį su etidžio bromidu (0,5 µg/ml). Elektroforezė buvo vykdoma 30-60 min. 5-7 V/cm. Į šulinėlius buvo užnešama po 10 µl paruoštų mėginių. Mėginiai buvo paruošiami naudojant DNA Loading Dye & SDS Solution (6X) (Thermo Fisher Scientific, #R1151) arba Orange DNA Loading Dye (6X) laikantis gamintojo rekomendacijų. DNA Loading Dye & SDS Solution (6X) buvo naudojamas analizuojant DNR hidrolizės produktus. Orange DNA Loading Dye (6X) buvo naudojamas vykdant genų inžinerijos eksperimentus. Po elektroforezės DNR fragmentai analizuojami ir dokumentuojami Ultra-Lum sistema.

Baltymų elektroforezė

SDS-PAGE buvo atliekama 12 % poliakrilamidiniame gelyje. Užnešimui mėginiai (po 20 μ l) buvo ruošiami naudojant 4x DualColor™ Protein Loading Buffer Pack laikantis gamintojo rekomendacijų. Užnešama buvo po 5 μ l mėginio į šulinėlį.

Geliai elektroforezei (0,75 mm storio) buvo ruošiami naudojant Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems laikantis gamintojo rekomendacijų išskyrus tai, kad ruošiant frakcionuojantį gelį ant jo mišinio formoje paliekant polimerizacijai vietoj vandens buvo užpilamas izopropanolis. Ruošiant frakcionuojantį gelį kartu su atitinkamu buferiu į galutinį mišinį buvo pridedama Rotiphorese® Gel30 (37,5:1), 10 % APS bei TEMED (į 5 ml atitinkamai 1,25 ml, 30 μ l, 6,5 μ l). Analogiškai ruošiant koncentruojantį gelį kartu su atitinkamu buferiu į galutinį mišinį buvo pridedama Rotiphorese® Gel30 (37,5:1), 10 % APS 1,25 ml bei TEMED (į 5 ml atitinkamai 0,625 ml, 12,5 μ l, 10 μ l).

Elektroforezė buvo vykdoma naudojant Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Ji būdavo pradėdama esant 13 mA srovės stipriui, kuris būdavo padidinamas iki 25 mA, kai mėginiai pereina į frakcionuojantį gelį. Baigus elektroforezę geliai praplaunami Milli-Q™ vandeniui ir laikomi fiksavimo buferyje (~100 ml 1-nam geliui) 30 min. Gautų gelių dažymas buvo atliekamas naudojant PageBlue™ Protein Staining Solution laikantis gamintojo rekomendacijų.

Gelių vaizdai buvo analizuojami naudojant TotalLab Quant programinę įrangą.

Western Blot analizė

Po baltymų elektroforezės baltymai buvo pernešami iš gelio ant membranos naudojant The Mini Trans-Blot® Cell. Iš pradžių PVDF membrana veikiama 5 min. 100 % metanoliu ir laikantis gamintojo rekomendacijų surenkamas pernešimo „sumuštinis“ bei pripildoma pernešimo buferio.

Pernešimas vykdomas ~ 1 val. palaikant 100 V. Po to membrana 1 val. laikoma (purtant) blokavimo buferyje. Po blokavimo 1 val. inkubuojama su antikūnu prieš His₆ žymenį (2000 skiestas su blokavimo tirpalu). Po šios inkubacijos seka 3 plovimai po 15 min. su PBS-T buferiu ir 2 plovimai po 5 min. su PBS buferiu. Po šių manipuliacijų membrana inkubuojama su šarminės fosfatazės chromogeniniu substratu BCIP/NBT (tabletė ištirpinama 30 ml. vandens). Susidarius violetinėms nuosėdoms reakcija stabdoma membraną plaunant vandeniu.

Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Hipotezės bei tikslų formulavimas

Darbo pradžioje buvo analizuojami duomenys viešai prieinamose duomenų bazėse. Buvo tikimasi rasti prokariotinių DNazės I šeimos (IPR016202, [76]) baltymų iš halofilinių / druskingumui pakančių organizmų. Buvo daroma prielaida, kad jie gali būti daug atsparesni joninei jėgai lyginant su eukariotinėmis DNazėmis. Preliminari analizė parodė, kad dalis tokių baltymų turi ir papildomų domenų greta nukleazinio. Tai leido daryti prielaidą, kad domeninė organizacija yra susijusi su baltymo adaptacija, leidžiančia DNR hidrolizę vykdyti esant aukštai joninei jėgai.

3.2. Halofilinių / druskingumui pakančių mikroorganizmų, turinčių DNazės I šeimos baltymus, duomenų bazės kūrimas

Norint susieti baltymo domeninę organizaciją su jo adaptacija veikti didelės joninės jėgos sąlygomis reikėjo surinkti du pradinių duomenų rinkinius:

1. DNazės I prokariotinių homologų sekų rinkinį ir informaciją apie jų domeninę organizaciją.
2. Informaciją apie atitinkamų prokariotų, kurių genomuose rasti DNazės I homologai, pakantumą druskingumui.

3.2.1. DNazės I homologų rinkinys

Buvo analizuojamos sekos iš InterPro 4.6 duomenų bazės [76], kurios šioje duomenų bazėje buvo priskirtos DNazės I šeimai (IPR016202, [76]) ir yra rastos prokariotinių organizmų genomuose. Tokių sekų buvo rasta ~300. Kartu analizuoti labai panašias sekas nėra prasmės, todėl buvo panaudoti UniRef90 klasteriai, kuriuose į klasterius apjungtos 90 % identiškos ir panašesnės sekos. Tokių klasterių gauta 86-i. Šių klasterių reprezentacinės sekos buvo naudotos tolesnėje analizėje.

Reikia pabrėžti, kad analizei naudota InterPro 4.6 versija. Vėlesnėse InterPro versijose, sekų priskiriamų DNazės I šeimai (IPR016202), skaičius augo: 4.9 versijoje jau yra 524-ios prokariotų sekos, priskiriamos DNazės I šeimai. Vis dėlto analizės tikslas buvo rasti galimas sąsajas tarp domeniškos organizacijos ir organizmų pakantumo druskingumui, todėl absoliučios daugumos į DNazes panašių sekų analizuoti nebuvo būtina.

3.2.2. Prokariotų tolerancijos druskingumui duomenys

Kiekvienam atrinktą analizei seką atitinkančiam organizmui reikėjo surinkti informaciją apie atsparumą joninei jėgai. Deja, nepavyko rasti viešai prieinamos duomenų bazės, kurioje būtų buvę galima surasti reikiamus duomenis. Buvo surinkta publikacijose prieinama informacija apie mikroorganizmų, kurių genomuose buvo rastos 86-ios analizei parinktos sekos, toleranciją druskingumui. Jei literatūroje nebuvo tiesiogiai pateikta informacija apie mikroorganizmų pakantumą druskingumui, tuomet buvo remiamasi netiesioginiais duomenimis, tokiais kaip gyvenamoji aplinka ar mėginio paėmimo vieta, ir pagal juos buvo sprendžiama apie mikroorganizmo atsparumą druskingumui. Surinkti duomenys pateikiami 3.1 lent. Šioje lentelėje pateikiama informacija apie tiesiogiai literatūroje cituotą ar numanomą iš netiesioginių duomenų mikroorganizmų atsparumą druskingumui, baltymų sekų prieigos kodai, naudoti literatūros šaltiniai.

3.1 lentelė. Mikroorganizmų, kurie turi į DNazę I panašius baltymus, pakantumas druskingumui

Reprezentacinė rūšis / Filogenetinio medžio lapo pavadinimas	UniRef90 klasteris (reprezentacinės sekos prieigos kodas)	Maks. NaCl konc., M	Sąlyginis pakantumo druskingumui lygis	Duomenų šaltiniai
<i>Bizionia argentinensis</i> JUB59	G2EGF9	1,00	vidutinis	[110]
<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	A3ZMZ4, A3ZS40	1,00	vidutinis	[111]
<i>Cetobacterium somerae</i> ATCC BAA-474	U7VDD6	0,00	nežymus /	[112]
<i>Corallococcus coralloides</i> ATCC 25202	H8MMN3	0,17	nežinomas nežymus /	[113]
<i>Deinococcus deserti</i> VCD115	C1D1Q7	0,10	nežinomas nežymus /	[114]
<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300	Q1IZR2	0,00	nežinomas nežymus /	[115]
<i>Deinococcus maricopensis</i> DSM 21211	E8U979	0,00	nežinomas nežymus /	[116]
<i>Deinococcus proteolyticus</i> ATCC 35074	F0RL87	0,85	nežinomas vidutinis	[117]
<i>Deinococcus radiodurans</i> ATCC 13939	Q9RZQ3	0,00	nežymus /	[118]
<i>Fibrisoma limi</i> BUZ 3	I2GRN0	0,34	nežinomas silpnas	[119]
<i>Flavobacterium branchiophilum</i> FL-15	G2Z3P7	0,00	nežymus /	[120]
<i>Flavobacterium frigoris</i> PS1	H7FLG2	0,85	nežinomas vidutinis	[121]
<i>Flavobacterium indicum</i> DSM 17447	H8XPU7	0,34	silpnas	[122]
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> ATCC 17061	A5FNZ6	0,00	nežymus /	[123]
<i>Flavobacterium</i> sp. CF136	J3BY94	0,00	nežinomas nežymus / nežinomas	[124]

Tęsinys kitame lape

<i>Flavobacterium</i> sp. F52	J0RRS2	0,00	nežymus / nežinomas	[124]
<i>Flexibacter litoralis</i> ATCC 23117	I4ALP5	0,00	silpnas	[125]
<i>Formosa</i> sp. AK20	M7MKE5	0,00	silpnas	[126]
<i>Fusobacterium mortiferum</i> ATCC 9817	C3WAK9	0,00	nežymus / nežinomas	[127]
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 1_1_36S	H1D400	0,00	nežymus / nežinomas	[128]
<i>Fusobacterium necrophorum</i> ATCC 51357	I3DDW2	0,00	nežymus / nežinomas	[128]
<i>Fusobacterium necrophorum</i> D12	E5BLB3	0,00	nežymus / nežinomas	[128]
<i>Fusobacterium nucleatum</i> 4_8	R9R DT2	0,00	nežymus / nežinomas	[129]
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Q8R5P1	0,00	nežymus / nežinomas	[129]
<i>Fusobacterium periodonticum</i> 2_1_31	C3WGZ0	0,00	nežymus / nežinomas	[129]
<i>Fusobacterium</i> sp. F0437	G6C0F0	0,00	nežymus / nežinomas	[130]
<i>Fusobacterium varium</i> ATCC 27725	C6JIF4	0,00	nežymus / nežinomas	[130]
<i>Gillisia limnaea</i> DSM 15749	H2BXJ8	0,85	vidutinis	[131, 132]
<i>Halomonas</i> sp. A3H3	T2LFY5	1,50	vidutinis	[133]
<i>Halomonas</i> sp. HAL1	G4F511	2,00	vidutinis	[134]
<i>Halomonas</i> sp. PBN3	U7P800	0,00	silpnas	[135]
<i>Halomonas</i> sp. TD01	F7SPZ3	3,42	didelis	[136, 137]
<i>Ilyobacter polytropus</i> DSM 2926	E3H9Z7	0,00	nežymus / nežinomas	[138]
<i>Kordia algicida</i> OT-1	A9DNF0	0,85	vidutinis	[139]
<i>Leptospira interrogans</i> str, FPW2026	J4U625	0,00	nežymus / nežinomas	[140]

Tęsinys kitame lape

<i>Leptotrichia buccalis</i> ATCC 14201	C7N942	0,00	nežymus /	[141]
<i>Leptotrichia goodfellowii</i> F0264	D0GJB4	0,00	nežinomas nežymus /	[142]
<i>Leptotrichia hofstadii</i> F0254	C9MV32	0,00	nežinomas nežymus /	[142]
<i>Leptotrichia</i> sp. F0557	U2Q3R8	0,00	nežinomas nežymus /	[130]
<i>Leptotrichia</i> sp. W9775	U2SK95	0,00	nežinomas nežymus /	[142]
<i>Leptotrichia wadei</i> F0279	U2PRB5	0,00	nežinomas nežymus /	[142]
<i>Meiothermus silvanus</i> ATCC 700542	D7BD91	0,20	nežinomas nežymus /	[138]
<i>Methanococcoides burtonii</i> DSM 6242	Q12YY7	0,50	nežinomas silpnas	[143]
<i>Methanohalobium evestigatum</i> DSM 3721	D7E828	5,10	didelis	[144]
<i>Methanoplanus limicola</i> DSM 2279	H1Z285	0,92	vidutinis	[145]
<i>Methanoplanus petrolearius</i> DSM 11571	E1RK68	0,85	vidutinis	[146]
<i>Methanosarcina barkeri</i> Fusaro	Q467S8	0,00	nežymus /	[147]
<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 3837	K1HGB8	1,03	nežinomas vidutinis	[148]
<i>Myroides odoratus</i> DSM 2801	H1Z8R7	0,86	vidutinis	[148]
<i>Myxococcus</i> sp.	U2SKR7	0,26	nežymus /	[149]
<i>Muricauda ruestringensis</i> DSM 13258	G2PLU4, G2PQ99	1,54	nežinomas vidutinis	[150]
<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	D5C5F3	1,60	vidutinis	[151, 152]
<i>Nitrosococcus watsoni</i> C-113	D8KCF8	0,80	vidutinis	[151]
<i>Nonlabens dokdonensis</i> DSM 17205	L7WAP7	1,37	vidutinis	[153, 154]
<i>Pedobacter</i> sp. BAL39	A6EH02	0,50	silpnas	[155]
<i>Pirellula staleyi</i> ATCC 27377	D2R4L4	0,30	nežymus /	[111]
<i>Planctomyces brasiliensis</i> ATCC 49424	F0SFA3	1,70	nežinomas vidutinis	[156]

Tęsinys kitame lape

<i>Planctomyces maris</i> DSM 8797	A6C718	0,70	silpnas	[156]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 39016	E2ZVF4	0,00	nežymus /	[157]
<i>Pseudomonas putida</i> S12	V4H6S2	0,50	nežinomas silpnas	[158]
<i>Pseudomonas syringae</i> ES4326	F3HK83	0,00	nežymus /	[159]
<i>Pseudomonas sp.</i> M47T1	I4MVP4	0,00	nežinomas nežymus /	[160]
<i>Psychroflexus torquis</i> ATCC 700755	K4IGL3	0,80	nežinomas vidutinis	[161]
<i>Rhodopirellula baltica</i> SH1	Q7UV93	1,20	vidutinis	[111]
<i>Rhodopirellula baltica</i> WH47	F2AS22	1,20	vidutinis	[111]
<i>Rhodopirellula maiorica</i> SM1	M5RC55, M5S411	0,00	silpnas	[162]
<i>Rhodopirellula sallentina</i> SM41	M5UED4	0,00	silpnas	[162]
<i>Rhodopirellula sp.</i> SWK7	M5T112, M5TEL8	0,00	silpnas	[162]
<i>Salipiger mucosus</i> DSM 16094	S9QWK2	3,42	didelis	[163]
<i>Sebaldella termitidis</i> ATCC 33386	D1AKL2	0,00	nežymus /	[164]
<i>Simiduia agarivorans</i> DSM 21679	K4KHZ4	1,19	nežinomas vidutinis	[165]
<i>Streptobacillus moniliformis</i> ATCC 14647	D1AYT4	0,00	nežymus /	[166]
<i>Thaumarchaeota archaeon</i> SCGC AB-539-E09	M7TTD1	0,00	nežinomas silpnas	[167]
<i>Thermus sp.</i> CCB_US3_UF1	G8N853	0,00	silpnas	[168]
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	G9MB93	0,86	vidutinis	[169]
<i>Thermus thermophilus</i> JL-18	H9ZV47	0,00	nežymus /	[170]
<i>Thioalkalivibrio sp.</i> K90mix	D3SGB1	4,00	nežinomas didelis	[171]
<i>Treponema azotonutricium</i> ATCC BAA-888	F5YE44	0,00	nežymus /	[172, 173]
<i>Treponema primitia</i> ATCC BAA-887	F5YJE1	0,00	nežinomas nežymus /	[173, 174]
unidentified eubacterium SCB49	A6EMT3	0,00	nežinomas silpnas	[175]

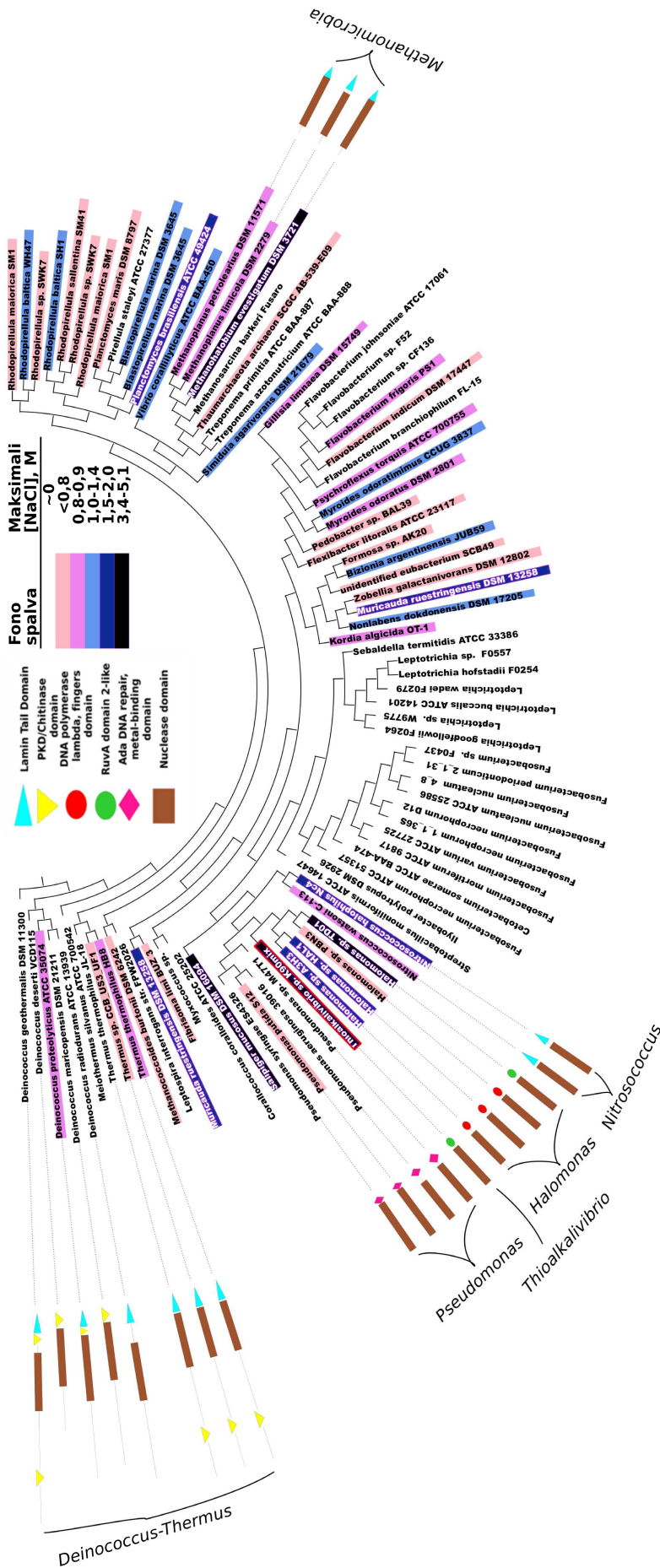
Kaip atspirties taškas ieškant sąsajų tarp domėninės organizacijos ir atsparumo druskingumui buvo pasirinkta maksimali druskos (NaCl) koncentracija (M), kuriai esant dar yra stebimas mikroorganizmo augimas. Ši informacija visoms 86-ioms sekoms iš 82-jų mikroorganizmų yra vizualiai pateikta 3.1 pav. Atlikta analizė parodė, kad 49-ios iš 86-ių analizei parinktų sekų yra randamos halofiliniuose / druskingumui pakančiuose organizmuose. 3.1 pav. mikroorganizmų pavadinimų fono spalva nurodo maksimalų druskingumą, kuriam esant mikroorganizmai dar gali augti. Buvo naudotos šešios pakantumo druskingumui kategorijos:

„~0“. Atitinka mikroorganizmus, kurie literatūroje buvo nelaikomi druskingumui pakančiais ar halofiliniais arba jų augimo aplinka/naudota auginimo terpė neleidžia daryti prielaidų apie atsparumą druskingumui. Priskirtos 39-nios rūšys (48 %).

„<0,8“. Atitinka silpnai halofilinius / druskingumui pakančius organizmus. Organizmas buvo priskirtas šiai kategorijai, jei literatūroje buvo tiesiogiai nurodyta atitinkama maksimali organizmo toleruojama NaCl koncentracija arba mikroorganizmas buvo aptiktas jūrinėje aplinkoje. Tokių silpnai halofilinių / druskingumui pakančių mikroorganizmų aptikta 16-ka (20%)

„0,8-0,9“, „1,0-1,4“, „1,5-2,0“, „3,4-5,1“. Šioms kategorijoms buvo priskiriami mikroorganizmai remiantis literatūroje konkrečiai nurodytomis maksimaliomis NaCl koncentracijomis. Nurodyti intervalai (imtinai) atitinka mažiausią ir didžiausią koncentraciją iš grupei priskirtų mikroorganizmų maksimalių NaCl koncentracijų, kurioms esant dar galimas augimas. 23-ys rūšys (28%) buvo priskirtos prie vidutiniškai halofilinių / druskingumui pakančių ([0,8-2,0] M NaCl) ir 4-turios rūšys (5%) buvo priskirtos prie itin halofilinių / druskingumui pakančių organizmų ($\geq 3,4$ M NaCl).

3.2. Halofilinių / druskingumui pakančių mikroorganizmų, turinčių DNazės I šeimos baltymus, duomenų bazės kūrimas



3.1 pav. Prokariotinių baltymų, kurie priskiriami DNazės I šeimai, filogenetinis medis bei jų domėninė organizacija. Kiekvienas lapas atitinka UniRef90 klasterio reprezentacinę seką. Filogenetinis medis buvo apskaičiuotas remiantis tik DNazinio domėno sekomis. Domėninė struktūra pavaizduota tų sekų, kuriose buvo aptikti papildomi domėnai greta DNazinio domėno. Domėnų pavadinimai atitinka InterPro 4.6 duomenų bazėje naudojamus pavadinimus, išskyrus nukleazinį domėną („Nuclease domain“) – jis atitinka Interpro duomenų bazės „exo/endo/phospho“ arba „DNaseI“ domėnus. Organizmo pavadinimo fono spalva žymi maksimalią koncentraciją, kurioje galimas atitinkamo mikroorganizmo augimas. Raudonas rėmelis žymi DNazę iš *Thioalkalivibrio sp.* (DNazę TA), kuri buvo parinkta eksperimentinei analizei.

3.3. DNazės I homologų filogenetinė bei domeninės struktūros analizė

Sekantis žingsnis buvo atlikti pasirinktų tyrimams sekų domeninės struktūros analizę. Filogenetinė bei domeninės struktūros analizė buvo atliekama siekiant identifikuoti konkrečius domenus, kurie galimai leidžia DNaziam domenui išlaikyti aktyvumą esant didelėms druskų koncentracijoms.

Kaip aptarta aukščiau, buvo analizuojamos 86-ios bakterinių DNazių sekos (atitinkamų UniRef90 klasterių reprezentacinės sekos). Filogenetinei analizei naudotos buvo tik nukleazinio domeno sekos. Gauto filogenetinio medžio topologija pateikta 3.1 pav. Atlikta analizė parodė, kad prokariotinės DNazės I šeimos baltymuose greta nukleazinio domeno aptinkami bent 5-ių tipų domenai:

1. Lamino uodegos domenas (angl. *Lamin. tail Domain*);
2. PKD / Chitinazės domenas (angl. *PKD / Chitinase domain*);
3. Ada DNR taisos / metalo surišimos domenas (angl. *Ada DNA repair / metal binding domain*);
4. Panašus į RuvA domeną 2 (angl. *RuvA domain 2-like*);
5. DNR polimerazės lambda pirštų domenas (angl. *polymerase lambda fingers domain*).

Lamino uodegos fragmentą turi DNazės iš trijų atskirų mikroorganizmų grupių: aukščiau jau minėtos DNazės iš *Deinococcus-Thermus* tipo, dvi DNazės iš *Nitrosococcus* genties bei trys DNazės iš *Methanomicrobia* klasės (*Methanoplanus* ir *Methanohalobium* gentys). Du iš atitinkamų šešių mikroorganizmų, priklausančių *Deinococcus-Thermus* klasei, yra vidutiniškai druskingumui pakantūs ir vienas – silpnai druskingumui pakantus. Tuo tarpu visi atitinkami organizmai iš *Nitrosococcus* genties ir *Methanomicrobia* klasės yra druskingumui pakantūs.

Analizė parodė, kad domeninės organizacijos aspektu iš visų prokariotinių DNazių išsiskiria baltymai iš *Deinococcus-Thermus* tipo organizmų. Šie baltymai turi arba PKD / Chitinazės, arba Lamino uodegos domeną, arba abu. PKD / Chitinazės domenai yra išskirtinai aptinkami tik DNazėse iš *Deinococcus-Thermus* tipo organizmų. Dvi iš aštuonių šių rūšių yra vidutiniškai druskingumui pakančios.

Ada DNR taisos / metalo surišimo domenai yra randami tik DNazėse iš keturių *Pseudomonas* rūšių. Tik viena iš jų yra silpnai druskingumui pakanti.

Paskutiniai du domenų tipai (panašus į RuvA domeną 2 bei DNR polimerazės lambda pirštų domeną), kuriuos 3.1 pav. žymimi raudonas bei žalias apskritimai, yra panašūs. Jie atitinka dvigubą spiralė-segtukaspiralė (angl. *helix-hairpin-helix*) motyvą, kuris žymimas santrumpa HhH. Tokie domenai aptinkami 5-iose bakterijų rūšyse iš dviejų genčių *Thioalkalivibrio* ir *Halomonas* ir jos visos yra druskingumui pakančios.

3.4. Sekrecijos signalo paieška DNazių iš labiausiai halofilinių / druskingumui pakančių mikroorganizmų sekose

Betarpiška didelėje joninėje jėgoje atsiduria tik į aplinką patenkančios halofilinio / druskingumui pakantaus mikroorganizmo baltymai. Taigi, vertinant domenų įtaką baltymo adaptacijai prie didelės joninės jėgos sąlygų, yra prasminga atsižvelgti ir į tai, ar analizuojami baltymai yra nukreipiami į sekrecinį kelią (angl. *secretory pathway*).

3.2 lentelė. Sekretijos signalo detekcija DNazių, iš labiausiai druskingumui pakančių prokariotų, sekose. Šie mikroorganizmai gali augti NaCl koncentracijai esant 1,5 M arba didesnei. Sekretijos signalo buvo ieškoma naudojant tris programas. Rezultatai, gauti naudojant SignalIP 4.1 [82] gram-neigiamoms bakterijoms ir PRED-SIGNAL [83] archėjinei sekai (*Methanohalobium evestigatum*), yra nurodyti kaip programos suformuluojama išvada apie sekretijos signalo buvimą arba nebuvimą baltymo sekoje. Pateikiant programos Philius rezultatus buvo nurodytas prognozuojamo baltymo tipas bei prognozės patikimumo įvertis. Nurodant papildomo domeno tipą, panašus į RuvA domeną 2 bei DNR polimerazės lambda pirštų domenas yra žymimi (HhH)₂.

UniRef90	Rūšis	Sekrecinio signalo prognozė *		Baltymo tipo** prognozė pagal Philius		Papildomas domenas	Maksimali augimo [NaCl], M
		SignalIP	PRED-SIGNAL	Tipas**	Patikimumo įvertis		
D7E828	<i>Methanohalobium evestigatum</i> DSM 3721	-	T	GS	0,99	Lamino uodegos	5,1 ¹
D3SGB1	<i>Thioalkalivibrio</i> sp. K90mix	T	-	GS	0,99	(HhH) ₂	4 ²
F7SPZ3	<i>Halomonas</i> sp. TD01	T	-	GS	0,98	(HhH) ₂	3,42 ³
S9QWK2	<i>Salipiger mucosus</i> DSM 16094	N	-	GS	0,71	-	3,42 ⁴
G4F511	<i>Halomonas</i> sp. HAL1	T	-	GS	0,99	(HhH) ₂	2 ⁵
F0SFA3	<i>Planctomyces brasiliensis</i> ATCC 49424	N	-	T	0,68	-	1,72 ⁶
D8KCF8	<i>Nitrosococcus halophilus</i> Nc4	T	-	GS	0,99	Lamino uodegos	1,60 ⁷
G2PLU4	<i>Muricauda ruestringensis</i> DSM 13258	N	-	G	0,99	-	1,54 ⁸
G2PQ99	<i>Muricauda ruestringensis</i> DSM 13258	N	-	GS	0,99	-	1,54 ⁸
T2LFY5	<i>Halomonas</i> sp. A3H3	N	-	GS	0,91	(HhH) ₂	1,5 ⁹

* T- sekretinis signalas detektuotas, N – sekretinis signalas nedetektuotas.

** GS – globulinis su signaliniu peptidu, G – globulinis, T – transmembraninis. ¹ [144] ² [171] ³ [137] ⁴ [163] ⁵ [134]

⁶ [156] ⁷ [152] ⁸ [150] ⁹ [133]

Remiantis surinktais duomenimis (3.1 pav.) galime suskaičiuoti dešimt DNazių iš druskingumui pakančių mikroorganizmų, kurie gali augti esant 1,5 M arba didesnei NaCl koncentracijai. Šių baltymų sekose buvo ieškota sekretinio signalo – rezultatai pateikti 3.2 lent. Rezultatai, gauti naudojant Philius ir SignalIP/PRED-SIGNAL programas, iš esmės sutampa. SignalIP/PRED-SIGNAL programų rezultatai rodo, kad iš keturių mikroorganizmų, kurie gali augti NaCl koncentracijai esant 3,4 M ir daugiau, vienas mikroorganizmas (*Salipiger mucosus*) turi DNazę be sekretinio signalo, o kitų trijų mikroorganizmų baltymai jį turi. Philius programos atveju, visuose keturiuose baltymuose sekretinis signalas randamas, bet, *Salipiger mucosus* atveju, ši detekcija yra nepatikima (patikimumo įvertis 0,71). Taigi trys iš keturių DNazių, aptinkamų ekstremaliai halofiliniuose / druskingumui pakančiuose organizmuose (≥ 3.4 NaCl), turi sekretinį signalą ir šie trys baltymai turi papildomą DNR rišantį domeną (Lamino uodegos arba dvigubo HhH motyvo), sulietą su nukleaziniu domenu.

Analizuojant DNazes iš mažiau pakančių druskingumui organizmų ($\geq 1,5$ M ir $< 3,4$ M NaCl) SignalIP ir Philius prognozės nesutampa. Baltymai iš *Muricauda ruestringgensis* (dvi DNazės), *Halomonas sp. A3H3* ir *Plancotomyces brasiliensis* neturi sekretinio signalo remiantis SignalIP/PRED-SIGNAL. Tuo tarpu Philius nurodo, kad tik du iš šių keturių baltymų turi sekretinį signalą.

3.5. Domeninės organizacijos bei atsparumo druskingumui sąryšis

PKD / Chitinazės ir Lamino uodegos domenai aptinkami DNazėse iš mikroorganizmų, priklausančių *Deinococcus-Thermus* tipui. Iš kitų bakterinių DNazių šie fermentai išsiskiria tuo, kad turi daugiau nei vieną domeną ir gan didelę sekos sritį, kurioje neaptinkama žinomų domenų. Taip pat tik du iš aštuonių atitinkamų mikroorganizmų pasižymi atsparumu joninei jėgai. Taigi labai mažai tikėtina, kad atitinkama multidomeninė

fermentų architektūra yra susijusi su prisitaikymu veikti didelės joninės jėgos sąlygomis.

Likę keturi domeninės architektūros tipai turi tik po vieną papildomą domeną prie DNazinio domeno. Šie domenai yra Ada DNR taisos / metalo surišimo, Lamino uodegos, panašus į RuvA domeną 2 bei DNR polimerazės lambda pirštų domenai. Ada DNR taisos / metalo surišimos domenai aptinkamas keturiose DNazėse iš keturių *Pseudomonas* rūšių. Iš jų tik viena rūšis yra silpnai pakanti druskingumui. Taigi ir ši architektūra negali būti susijusi su adaptacija didelei joninei jėgai.

Panašus į RuvA domeną 2 bei DNR polimerazės lambda pirštų domenai yra labai panašūs ir atitinka dvigubą HhH motyvą. Taigi belieka tik dvi prokariotinių DNazių architektūros, kurios gali būti susijusios su adaptacija prie didelės joninės jėgos: i) nukleazės domenai, sulietas su domenais turinčiais HhH dvigubą motyvą, ii) nukleazės domenai, sulietas su Lamino uodegos domenu.

Visos analizuotos nukleazės turinčios domeną su dvigubu HhH motyvu yra aptinkamos halofiliniuose ar druskingumui pakančiuose mikroorganizmuose. Vienas iš jų yra ekstremaliai druskingumui pakantus mikroorganizmas *Thioalkalivibrio sp. K90mix*, kiti keturi mikroorganizmai priklauso keturioms *Halomonas* genties rūšims, iš kurių tik viena yra silpnai pakanti joninei jėgai.

Lamino uodegos domenai randamos dviejose DNazėse iš *Nitrosococcus* genties bei trijose DNazėse iš *Methanomicrobia* klasės. Visos atitinkamos bakterijos yra halofilinės arba pakančios druskingumui, o viena jų *Methanohalobium evestigatum* yra ekstremalus halofilas.

Taigi matome, kad remiantis analizuotais duomenimis, dvi domeninės architektūros yra aptinkamos tik halofiliniuose ar druskingumui pakančiuose prokariotuose. Šiais atvejais DNazės domenai yra sulietas su domenu, turinčiu dvigubą HhH motyvą, arba su Lamino uodegos domenu. Šie du domenai nėra vienas kito homologai, bet gali būti funkciniai analogai.

HhH dvigubo motyvo domenai yra gerai žinomi, kaip domenai rišantys DNR ir randami daugelyje baltymų, sąveikaujančių su DNR [54]. Lamino uodegos domenas buvo pirmą kartą aptiktas eukariotinių ląstelių branduolio apvaskalėlio baltymuose ir taip pat dalyvauja sąveikoje su DNR [176]. Taigi abu šie domenų tipai turėtų sąveikauti su DNR. Gerai žinoma, kad joninė jėga silpnina specialiai prie didelės joninės jėgos neprisitaikiusio baltymo sąveiką su DNR, nes kartu su didėjančia jonine jėga didėja dielektrinė konstanta ir silpnėja elektrostatinės sąveikos. Taigi su DNR sąveikaujantis domenas galėtų funkcionuoti kaip pagalbinis sąveikos su DNR paviršius ir įgalintų vykdyti DNR hidrolizę didelės joninės jėgos sąlygomis.

Analizuojant DNazes iš prokariotų, kurie gali augti esant $\sim 1,5$ M ir daugiau NaCl (3.1 pav.), buvo aptikta dešimt DNazių iš devynių mikroorganizmų. Iš šių baltymų penkios DNazės savo sekose turi sekretinį signalą, kurį detektuoja dvi programos (3.2 lent.). Visos šios DNazės (3.2 lent.) turi su DNR sąveikaujančius domenus. Taigi turimi duomenys leidžia išvelgti galimą sąryšį: jei vidutiniškai/stipriai druskingumui pakantaus mikroorganizmo DNazė yra sekretuojama į išorę – tuomet ji turės DNR rišantį domeną. Vis dėlto šis dėsningumas yra gana spekuliatyvus. Sekretinio signalo detekcija šiuo metu, deja, yra riboto patikimumo. Be to, tai, kad fermentas patenka į sekretinį kelią, reiškia tik baltymo galimybę būti sekretuojamu per SecII kelią, o ne patį sekrecijos faktą. Taip pat baltymas gali būti sekretuojamas ir neklasikiniu keliu [177].

Siekiant įrodyti, kad DNR rišantis domenas gali būti evoliucijos eigoje išsivysčiusi adaptacija įgalinanti DNR hidrolizę esant didelėms druskos koncentracijoms, buvo nuspręsta parinkti vieną tokią DNazę ir eksperimentiškai patikrinti DNR rišančio domeno svarbą. Iš penkių galimai sekretuojamų DNazių, randamų vidutiniškai/stipriai pakančių druskingumui mikroorganizmų genomuose, trys DNazės greta nukleazinio domeno turi domeną su dvigubu HhH motyvu (3.2 lent.). Eksperimentinei analizei buvo parinkta DNazė iš ekstremaliai druskingumui pakantaus mikroorganizmo

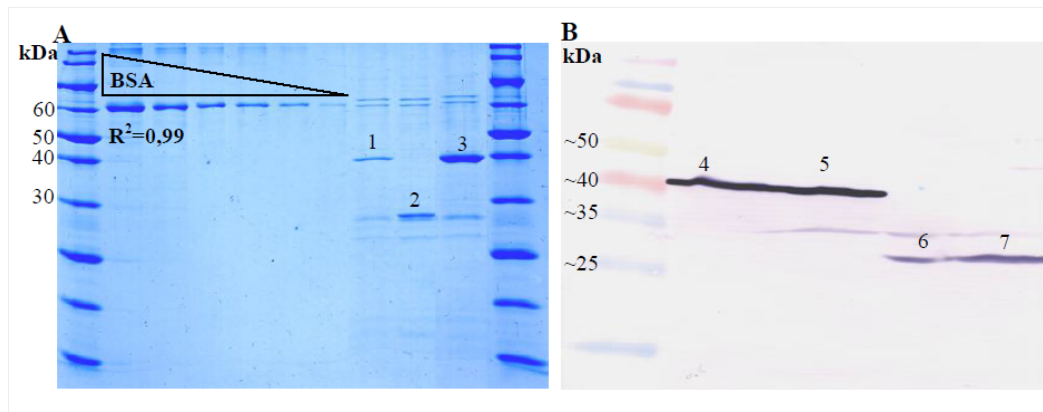
Thioalkalivibrio sp. K90mix su domenu, turinčiu dvigubą HhH motyvą.

3.6. DNazės TA mutantai ir jų gryninimas

Buvo siekiama eksperimentiškai įrodyti, kad DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atsparumą joninei jėgai lemia domenai su dvigubu HhH motyvu. Dėl to buvo sukonstruoti du DNazės TA mutantai:

- DNazės TA mutantas su pašalintu C-galiniu domenu paliekant tik DNazinį domeną (DNazė TA ΔC);
- DNazės TA mutantas, kurio DNazinio domeno aktyviajame centre įvesta inaktyvuojanti mutacija pakeičiant vieną iš katalitinių histidinių alaninu (DNazė TA H134A).

Šių dviejų mutantų bei laukinio tipo DNazės TA savybės buvo tirtos naudojant preparatus, gautus po vienos gryninimo stadijos. DNazės TA mutantų ir laukinio tipo DNazės TA preparatų SDS-PAGE elektroforegramos bei *Western Blot* analizės rezultatai pateikti 3.2 pav.



3.2 pav. DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* bei jos mutantų, išgrynintų per Ni^{2+} - NTA kolonėlę SDS - PAGE (A) bei *Western Blot* analizės (B) nuotraukos. A paveiksle parodyti BSA standartai kalibracinei tiesei (atitinkamai 437,5 ng, 218,8 ng, 109,4 ng, 54,7 ng, 27,3 ng, 13,7 ng), kuri buvo naudota densitometrinei analizei nustatant baltymų koncentracijas. 1 – DNazė TA (DNazė iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*), 2 – DNazė TA su pašalintu C-galiniu domenu (DNazė ΔC), 3 – katalitinio centro mutantas DNazė TA H134A. B dalyje pateikti *Western Blot* (antikūnai prieš poly-His): 4 – DNazė TA iš netirpios frakcijos, 5 – DNazė TA iš tirpios, 6 – DNazė TA ΔC iš netirpios frakcijos, 7 – DNazė ΔC iš tirpios.

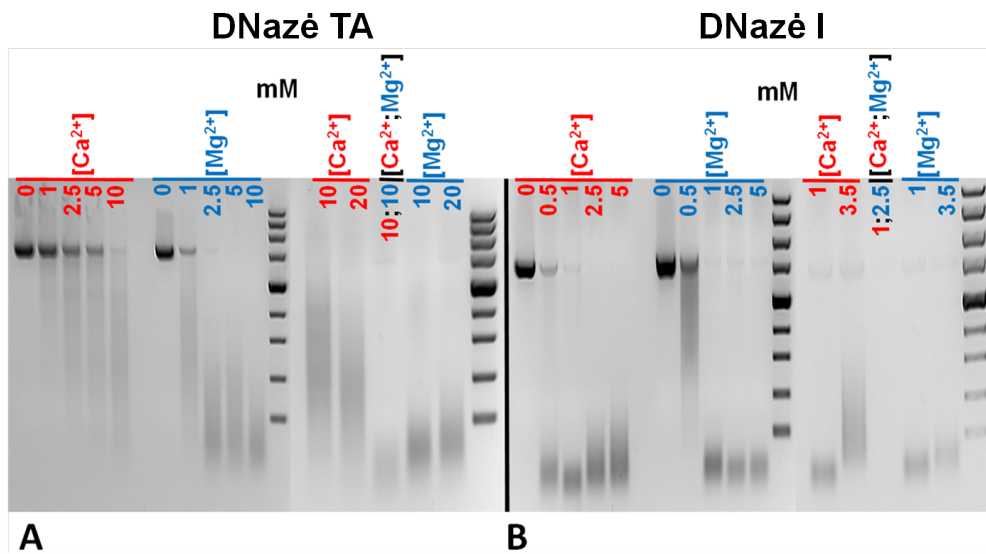
Kadangi gautuose baltyminiuose preparatuose buvo priemaišinių baltymų, tikslinių baltymų koncentraciją buvo nustatyta atliekant densitometri-
nę analizę. Iš *Western Blot* duomenų akivaizdu, kad DNazė TA ir DNazės
TA ΔC mutantas yra iš dalies tirpūs baltymai. Tačiau, kaip matome SDS-
PAGE elektroforegramose 3.2 pav., pavyko gauti tirpaus baltymo kiekius,
leidžiančius vertinti jo savybes. Pirminė užuomina apie tai, kad DNazė TA
yra aktyvi, buvo gauta auginant biomasę ir gryninant baltymus. Lyginant
DNazę TA ir DNazę TA H134A (katalizinio centro mutantas) mutanto at-
veju kultūros optinis tankis (600 nm) didėjo ženkliai greičiau (duomenys
nepateikti), ir, kaip matome iš pav. 3.2, mutanto gauname daugiau. Jei
DNazė TA yra aktyvi, o mutacija H134A yra aktyviajame centre, taip ir
turėtų būti, nes DNazinis rekombinantinio baltymo aktyvumas yra toksinis
Escherichia coli [178].

3.7. DNazės TA katalizuojama DNR hidrolizė bei ko- faktorių poreikis

Kaip jau aptarta literatūros apžvalgoje, DNazės I kataliziniam veikimui
yra būtini divalenčiai katijonai. Taigi, pavykus gauti tirpaus baltymo
preparatus, kitais eksperimentinės analizės žingsniais buvo siekiama: i)
įvertinti, ar laukinio tipo DNazė TA apskritai pasižymi DNaziniu aktyvu-
mu; ii) įvertinti, kokie yra jos poreikiai divalenčių metalų jonams. Gauti
rezultatai pateikiami 3.3 pav.

Vertinant plazmidės karpymą (3.3 pav.) buvo įrodyta, kad DNazė TA
turi DNazinį aktyvumą. Literatūroje nepavyko aptikti publikacijos, kurio-
je būtų eksperimentiškai pademonstruotas DNazės I bakterinio homologo
aktyvumas – šiame darbe pateiktais tyrimais tai būtų padaryta pirmą kar-
tą.

Taip pat iš 3.3 pav. pateiktų rezultatų matome, kad abiem lygintiems
fermentams, vykdant DNR hidrolizę, reikia divalenčių metalų: katalizė
vyksta esant tik Ca^{2+} arba Mg^{2+} jonams, arba jų kombinacijai. Tačiau



3.3 pav. Skirtingi divalenčių katijonų poreikiai lyginant jaučio DNazę I (B) ir DNazę iš *Thioalkalivibrio sp.* (A). Buvo įvertinta keletas skirtingų Ca^{2+} ir Mg^{2+} koncentracijų bei jų kombinacijų siekiant įvertinti optimumą. Kaip substratas buvo naudojama linearizuota pUC19 plazmidė.

poreikis yra skirtingas. DNazei TA reikia ženkliai didesnių katijonų koncentracijų lyginant su jaučio DNaze I. DNazės TA atveju apytiksliai nustatyta optimali katijonų kombinacija yra ~ 10 mM Ca^{2+} ir ~ 10 mM Mg^{2+} (3.3 A pav.). Tuo tarpu jaučio DNazės I atveju atitinkamos koncentracijos yra ~ 1 mM and $\sim 2,5$ mM (3.3 B pav.). Taigi, geriausiai šie fermentai veikia esant Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonams. 3.3 pav. pateikiami rezultatai, gauti analizuojant ilgą DNR substratą (plazmidę).

16 bp DNR duplekso karpymo duomenys (3.3 lent.) taip pat rodo, kad buferyje esant optimaliai Ca^{2+} ir Mg^{2+} kombinacijai, katalizė vyksta efektyviau nei esant atitinkamoms tik vienos rūšies jonų koncentracijoms.

3.3 lentelė. Dvivalenčių katijonų poveikis DNazės TA ir DNazės I aktyvumui.

	DNazė TA			DNazė I		
	10 mM Ca ²⁺	10 mM Mg ²⁺	10 mM Ca ²⁺ , 10 mM Mg ²⁺	1 mM Ca ²⁺	2,5 mM Mg ²⁺	1mM Ca ²⁺ , 2,5 mM Mg ²⁺
Kofaktorių konc.						
Hidrolizės T _{1/2} , min. *	12,75	45,26	9,43	3,86	5,51	0,61

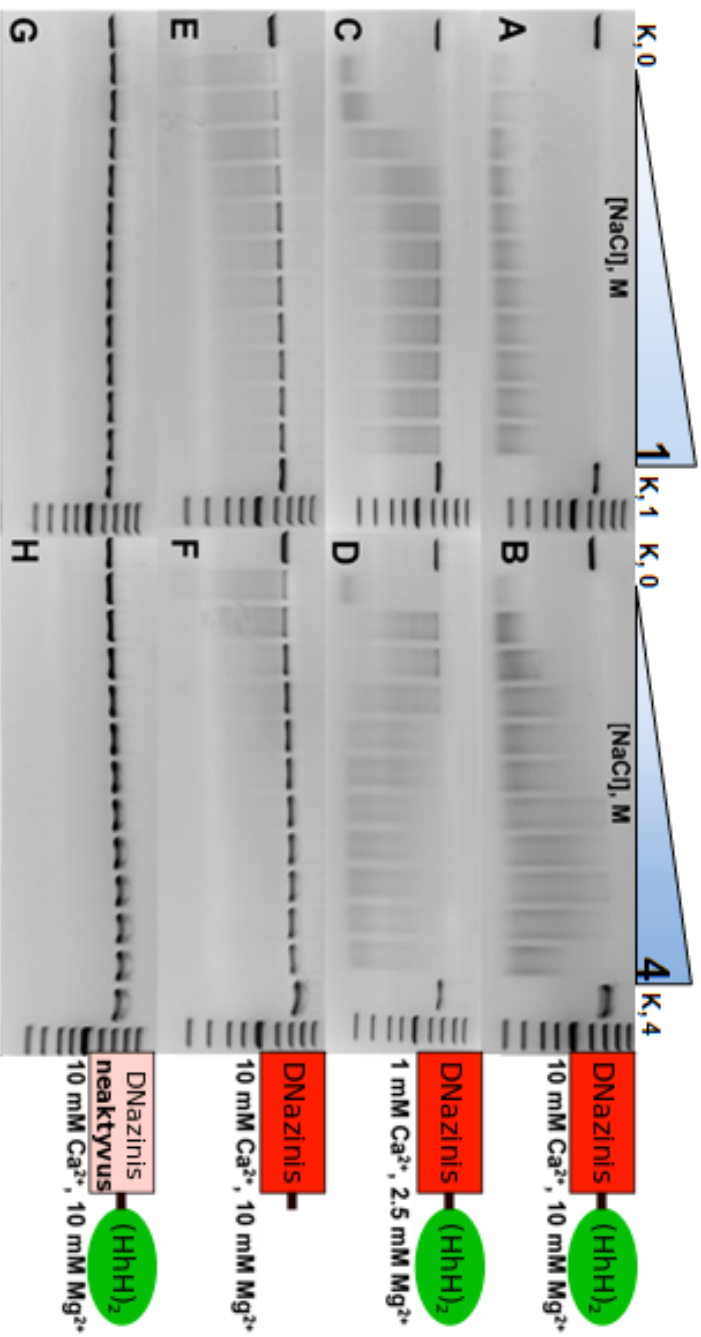
* matavimai atlikti vieną kartą, todėl paklaidos nepateikiamos. Šiuo atveju hidrolizės puslaikių patikimumas laikomas pakankamu, kadangi duomenys atitinka 3.3 pav. pateiktus rezultatus.

3.8. DNazės TA bei jos mutantų atsparumas joninei jėgai, rezultatai

Taigi nustatėme, kad DNazė TA iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* nėra pseudogenas, o pasižymi DNaziniu aktyvumu. Sekantis žingsnis – įvertinti, ar išties DNazė TA yra atspari joninei jėgai, ir pagal DNazės TA mutantų savybes patikrinti, ar atsparumą joninei jėgai lemia C-galinis domenas.

Rezultatai, gauti vertinant ilgo substrato (plazmidės) hidrolizę esant įvairioms NaCl koncentracijoms reakcijos mišiniuose, yra pateikti 3.4 pav. Rezultatai, rodantys DNazės TA savybes, yra pateikti 3.4 pav. A,B ir C,D dalyse. Šie du atskiri eksperimentai skiriasi naudotomis skirtingomis divalenčių katijonų koncentracijomis. Pirmuoju atveju (3.4 pav. A, B) buvo naudotos optimalios Ca²⁺ ir Mg²⁺ jonų koncentracijos. Antruoju atveju buvo naudota mažesnė divalenčių jonų koncentracija (3.4 C,D pav.), kuri atitinka koncentracijas, optimalias jaučio DNazei I.

Kaip matome elektroforegramose, esant 4 M NaCl, DNazė TA geba pastebimai hidrolizuoti DNR esant abiem tirtoms divalenčių jonų koncentracijoms. Tuo tarpu divalenčių katijonų koncentracijų įtaka tampa akivaizdi esant mažesnei joninei jėgai (iki ~1 M NaCl). Šiame NaCl koncentracijos intervale, esant optimalioms divalenčių kofaktorių koncentracijoms,



3.4 pav. DNazės iš *Thioalkalivorio sp. K90mix* (DNazė TA) bei jos mutantų veikimas skirtingose joninėse jėgose. Elektroforegramos kairėje pusėje rodo, kaip DNR karpoma nuo 0 iki 1 M NaCl, druskos koncentracijai didėjant po 0,1 M. Elektroforegramos dešinėje pusėje rodo aktyvumo kitimą nuo 0 iki 4 M NaCl, druskos koncentracijai didėjant po 0,4 M. Kontrolinės reakcijos, kuriose nebuvo dėta fermento preparato, dviejose skirtingose NaCl koncentracijose pažymėtos raide K.

cijoms, DNazė TA karmo DNR ir, didinant druskos koncentraciją, didėja stebimas reakcijos produktų ilgis (taigi ir mažesnis numanomas aktyvumas). Visiškai kitaip yra esant suboptimaliai (mažesnei) divalenčių kationų koncentracijai: didėjant joninę jėgą iki $\sim 0,4$ M NaCl, DNR hidrolizė yra ženkliai slopinama. Šiuo atveju elektroforegamoje ties 0,4 M NaCl galime stebėti net iki galo nesukarpytą pilno ilgio plazmidę. Tačiau, toliau didinant joninę jėgą, DNR degradacija vėl sustiprėja ir reakcijos produktai yra mažesni nei pilno ilgio plazmidė net ir esant 4 M NaCl.

Rezultatai, gauti analizuojant DNazė TA ΔC (pašalintas C-galinis domenas) mutantą, yra pateikti 3.4 pav. E ir F dalyse. Taigi šis mutantas yra aktyvus iki $\sim 0,6$ M NaCl ir elektroforegamoje DNR hidrolizės nestebima, kuomet NaCl koncentracija viršija 1,2 M NaCl. Tuo tarpu DNazės TA H134A mutantas, kurio DNazinio domeno katalizinis centras turėtų būti neveiklus, neskaldo DNR esant bet kuriai tirtai NaCl koncentracijai (3.4 G, H pav.).

Duomenys, gauti karpant trumpą 16 bp DNR dupleksą esant optimalioms Ca^{2+} ir Mg^{2+} jonų koncentracijoms, yra pateikti 3.4 lent. Šie duomenys papildo jau aptartus duomenis, gautus skaldant ilgą plazmidinės DNR substratą, ir rodo, kad DNazė TA geba hidrolizuoti DNR iki 4 M NaCl, DNazės TA ΔC mutantas be C-galinio domeno yra aktyvus tik esant žemai joninei jėgai, o DNazės TA DNazės domeno aktyviojo centro mutantas yra neaktyvus esant bet kuriai tirtai NaCl koncentracijai.

3.4 lentelė. Radioaktyvaus trumpo DNR substrato (16 bp) hidrolizės puslaikis nutatytas DNazėi TA (DNazė iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*) ir jos mutantams.

	DNazė TA	DNazė TA ΔC	DNazė TA H134A
NaCl, M	Substrato karpymo puslaikis $T_{1/2, \text{min}}$		
0	9,43	31,29	ND ¹
0,5	43,39	ND ¹	ND ¹
1,2	60,18	ND ¹	ND ¹
4,0	47,66	ND ¹	ND ¹

¹ ND – DNR hidrolizė nedetektuojama

3.9. DNazės TA bei jos mutantų atsparumas joninei jėgai, aptarimas

Eksperimentiniai duomenys rodo, kad prokariotinė DNazė TA yra atspari joninei jėgai ir geba vykdyti DNR hidrolizę. Tuo tarpu, DNazės TA variantas be C-galinio domeno yra ženkliai mažiau atsparesnis joninei jėgai. Akivaizdu, kad šio domeno buvimas baltymui leidžia vykdyti hidrolizę ir aukštoje, ir žemoje joninėje jėgoje. Taigi yra dvi galimybės: i) jis pats vykdo DNR hidrolizę, kuomet DNazinis domenas yra nebeaktyvus, ii) padeda DNaziniam domenui „atsispirti“ joninei jėgai ir katalizės centras išlieka tas pats. Kaip matėme, DNazės TA variantas su aktyviojo centro mutacija nekatalizuoja DNR hidrolizės esant bet kuriai tirtai joninei jėgai, o mutantas be C-galinio domeno mažiau toleruoja joninę jėgą nei laukinio tipo DNazė TA. Taigi tai leidžia teigti, kad C-galinis domenas DNazėje TA nepasižymi nukleaziniu aktyvumu, o „padeda“ DNaziniam domenui vykdyti DNR hidrolizę, esant didelei joninei jėgai.

Taip pat buvo nustatytas faktas, kad DNazės TA atsparumas joninei jėgai priklauso nuo divalenčių jonų. Esant mažai divalenčių jonų koncentracijai ir palaipsniui didinant joninę jėgą, išryškėja du aktyvumo pikai: vienas ties 0 mM NaCl, o kitas virš 1,2 M NaCl (3.4 C,D pav.). Toks

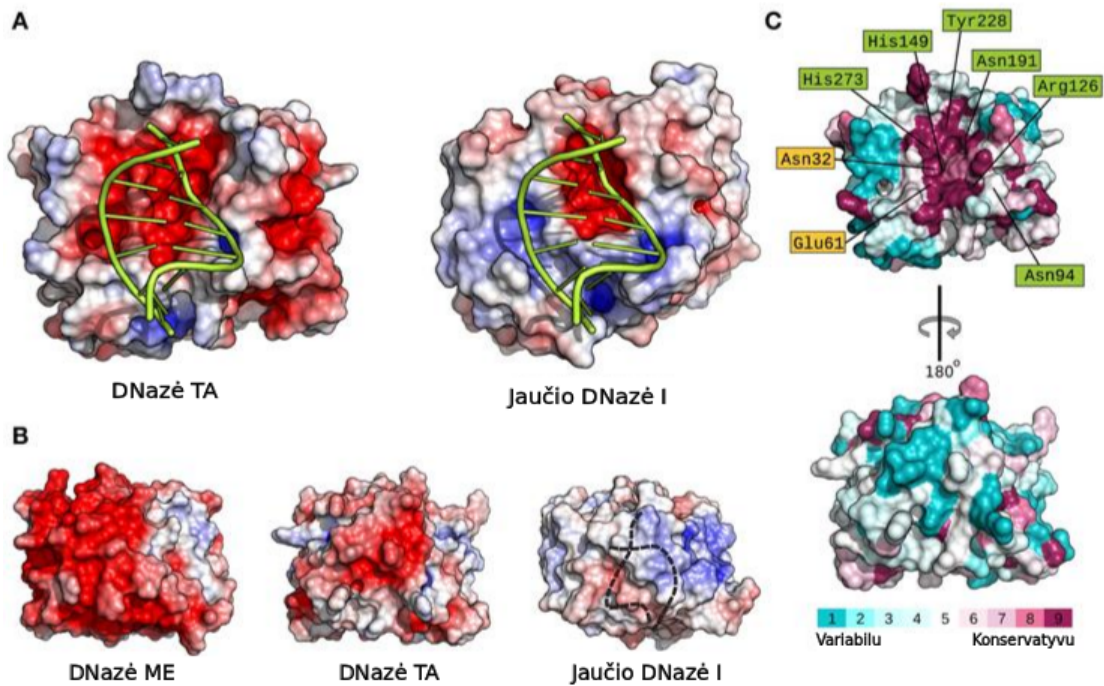
dvigubas aktyvumo pikas nėra artefaktas – jis buvo kelis kartus stebėtas pakartotinėse elektroforegramose (duomenys nepateikiami). Tuo tarpu esant optimalioms divalenčių jonų koncentracijoms jokio dvigubo aktyvumo piko nestebime. Remiantis šiais duomenimis galime daryti prielaidą, kad NaCl koncentracijoms esant iki $\sim 1,2$ M NaCl, didesnės divalenčių jonų koncentracijos padidina DNazės TA aktyvumą ir leidžia jį išlaikyti didėjant joninei jėgai.

Deja, nepavyko išsiaiškinti, kodėl, palaipsniui didinant druskos koncentraciją ir esant mažoms divalenčių jonų koncentracijoms, stebimi du DNazės TA aktyvumo pikai. Galima tik bandyti daryti prielaidas remiantis turimais duomenimis. Kaip jau parodėme, C-galinis domenas DNazėje TA leidžia vykdyti DNR hidrolizę esant itin aukštai joninei jėgai (bent iki 4 M NaCl). Be to, pagal literatūros duomenis *Thioalkalivibrio sp. K90mix* auga itin druskingoje aplinkoje [171]. Todėl DNazės TA C-galinis domenas turėtų būti prisitaikęs jungti DNR esant itin aukštai joninei jėgai. Tokiu atveju tikėtina, kad esant buferyje NaCl, šis domenas sąveikautų su DNR stipriau nei buferyje be NaCl. Taigi, esant mažoms druskos koncentracijoms, joninė jėga slopintų DNazės TA nukleazinio domeno sąveiką su DNR ir, atitinkamai, jos vykdomą katalizę, o C-galinis domenas pradėtų „pagelbėti“ DNaziniam domenui tik dar labiau pakėlus joninę jėgą. Toks modelis leidžia paaiškinti stebimus du aktyvumo pikus palaipsniui didinant joninę jėgą.

3.10. DNazės TA struktūrinio modelio analizė

3.10.1. DNazės TA paviršiaus elektrostatinio potencialo sąsaja su optimaliomis kofaktorių koncentracijomis

Taigi, eksperimentiškai tiriant DNazę iš *Thioalkalivibrio K90mix* buvo pastebėta, kad optimalios kofaktorių koncentracijos yra didesnės lyginant su jaučio DNaze I. Siekiant išsiaiškinti galimas to priežastis buvo sukurtas DNazės TA DNazinio domeno struktūrinis modelis ir įvertintas jo konser-



3.5 pav. Paviršiaus elektrostatinis potencialas ir evoliuciškai konservatyvios amino rūgštys. (A) DNazės TA (DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*) DNazinio domeno ir jaučio DNazės I elektrostatinis paviršiaus potencialas baltymo paviršiuje, kuris sąveikauja su DNR. DNR pozicija vizualiam vertinimui pavaizduota pagal jaučio DNazės ir DNR komplekso kristalografinę struktūrą (PDB ID: 1DNK). (B) Elektrostatinis paviršiaus potencialas tos baltymo pusės, kuri nugręžta nuo DNR: itin druskingumui pakantaus organizmo *Methanohalobium evestigatum* DNazės (DNazės ME) DNazinio domeno, mažiau pakantaus druskingumui mikroorganizmo *Thioalkalivibrio sp. K90mix* DNazės (DNazė TA) DNazinio domeno, jaučio DNazės I. Juoda linija su pertrūkiiais vaizduoja baltymo molekulės užstatą DNR. (C) Pateikiamas evoliucinis paviršinių amino rūgščių konservatyvumas tos DNazės TA DNazinio domeno pusės, kuri turėtų būti atsukta į DNR. Konservatyvumas pateikiamas spalvinėje skalėje: itin variabilias sritis žymi žydra, labai konservatyvias žymi tamsiai violetinė.

vatyvumas bei elektrostatinis paviršiaus potencialas (3.5 pav.). Analizuojant žmogaus DNazę I buvo parodyta, kad divalenčiai jonai yra būtini DNazės sąveikai su DNR, nes DNazės paviršius be prijungtų divalenčių metalo jonų yra elektroneigiamas ir dėl to negali jungtis su elektroneigiamą DNR [179].

Vizualizavus eukariotinės DNazės I bei DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* elektrostatinį paviršiaus potencialą (3.5 A pav.) akivaizdu, kad pastarosios DNazės (DNazės TA) DNazinis domenas turi didesnius paviršiaus plotus, kurių elektrostatinis potencialas yra neigiamas. Šis skirtumas yra itin akivaizdus ties aktyviuoju centru ir Mg^{2+} surišimo vieta. Logiška

manyti, kad DNazė TA, taip pat kaip ir eukariotinė DNazė I, gali sąveikauti su DNR tik tuomet, kada divalenčiai katijonai neutralizuoja neigiamą paviršiaus potencialą. Atsižvelgiant į didesnę neigiamą paviršiaus plotą yra labai tikėtina, kad ir daugiau divalenčių metalo jonų reikia DNazei TA prisijungti, lyginant su eukariotine DNaze I, ir, atitinkamai, optimaliam veikimui gali reikėti didesnių divalenčių jonų koncentracijų.

3.10.2. DNR rišantis domenas – dviejų evoliucinių spaudimų pasekmė

Elektrostatinis paviršiaus potencialas katalizinio centro srityje (3.5 pav.) yra neigiamas tiek DNazės TA, tiek jaučio DNazės I baltymuose. Akivaizdu, kad DNazės TA sąveikos su DNR paviršius turi ženkliai didesnes neigiamo elektrostatinio potencialo sritis nei jaučio DNazės I paviršius (3.5 A pav.). Analogiškas skirtumas yra akivaizdus ir DNazinio domeno paviršiuje tos baltymo pusės, kuri yra nugręžta nuo DNR (3.5 B pav.). Taigi, visas DNazės TA nukleazinio domeno paviršius yra labiau elektroneigiamas nei atitinkamas jaučio DNazės I paviršius.

Palyginimui, kartu su DNaze TA bei jaučio DNaze I 3.5 pav. B dalyje yra pavaizduotas elektrostatinis su DNR nesąveikaujančios baltymo paviršiaus potencialas, apskaičiuotas struktūriniam DNazinio domeno modeliui DNazės iš prokarioto *Methanohalobium vestigatum* (DNazės ME). Šios DNazės elektrostatinis potencialas yra labiausiai neigiamas iš visų paviršiaus potencialų pavaizduotų 3.5 B pav. Šio paveikslo B dalyje baltymas iš labiausiai druskingumui atsparaus organizmo yra pavaizduotas kairėje (DNazė ME), atitinkamas potencialas mažiau druskingumui pakantaus organizmo yra pavaizduotas per vidurį (DNazė TA) ir jaučio DNazė I yra pavaizduota dešinėje. Šiuo atveju, kuo labiau druskingumui pakantus organizmas yra, tuo atitinkamos DNazės paviršius yra labiau elektroneigiamas. Šių DNazės I homologų atveju stebime tendenciją, kuri stebima ir kitų baltymų iš halofilinių / druskingumui pakančių organizmų atve-

jais [39, 42–44].

Tai, kad DNazės TA DNazinio domeno DNR sąveikos paviršiuje stebime daugiau neigiamo krūvio aminorūgščių lyginant su DNaze I yra gana stebėtinas faktas. Studijoje, atliktoje Becker ir kit. [49], nebuvo stebima neigiamo krūvio aminorūgščių padaugėjimo tose baltymo paviršiaus srityse, kurios sąveikauja su nukleorūgštėmis, TATA dėžutę rišančių (angl. *TATA-binding*) baltymų bei ribosomos pratęsimo faktoriaus (angl. *ribosome elongation factor*) atvejais lyginant homologus iš halofilinių ir mezofilinių organizmų. Taip pat neigiamo krūvio aminorūgščių padaugėjimo nebuvo stebėta lyginant druskingumui pakančią endonukleazę I iš *Vibrio salmonicida* su homologu iš *Vibrio cholerae* [38].

Galima būtų teigti, kad toks neįprastas DNR rišančio paviršiaus „pārūgštėjimas“ DNazės I atveju yra dėl prisitaikymo veikti itin didelėse druskos koncentracijose – taip kaip yra PCNA iš *Haloferax volcanii* atveju [180]. Tačiau šiuo atveju PCNA yra sudėtingas DNR slystantis trimerinis baltymas ir jo sąveikos su DNR pobūdis turėtų smarkiai skirtis nuo fermentų. Be to, remiantis eksperimentiniais duomenimis (3.4 pav., 3.4 lent.), DNazės TA DNazinis domenas be DNR rišančio C-galinio domeno nėra pakantus joninei jėgai. Taigi, mažai tikėtina, kad neigiamų aminorūgščių padaugėjimas DNazės TA DNR sąveikos su DNR srityje yra dėl prisitaikymo sąveikauti su DNR didelės joninės jėgos sąlygomis. Tikėtina, kad atsirandant DNazei TA evoliucija vyko veikiant dviems, iš pirmo žvilgsnio nederantiems, evoliuciniams spaudimams ir buvo rastas kompromisas tarp būtinybės apsaugoti sąveikos su DNR sritį nuo „rūgštėjimo“ (angl. *acidification*), kuris potencialiai galėtų apsunkinti sąveiką su DNR, bei būtinybės pritaikyti baltymo paviršių aukštomis druskos koncentracijoms per papildomas rūgštines aminorūgštis, apsaugančias nuo agregacijos.

Vykstant adaptacijai prie aukštos joninės jėgos ir priešinant galimai baltymo molekulių agregacijai, baltymo paviršiuje kaupiasi neigiamo krūvio aminorūgštys ir paviršiaus elektrostatinis potencialas tampa vis labiau

neigiamas. Tačiau, daugėjant baltymo paviršiuje neigiamų aminorūgščių, gali būti apsunkinta sąveika su stiprų neigiamą krūvį turinčia DNR.

Taigi adaptacija, vykstanti vengiant baltymo agregacijos, gali slopinti katalizinį efektyvumą ir evoliucija turėjo „iešoti kompromiso“ tarp dviejų evoliucinių spaudimų. DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* domeninė architektūra ir DNazinio domeno paviršiaus savybės iliustruoja kaip aptartoji dilema buvo išspręsta. Kartu su elektrostatinio potencialo analizės rezultatais yra pateikti duomenys ir apie paviršinių aminorūgščių konservatyvumą (3.5 C pav.). Galime aiškiai matyti, kad aktyvaus centro bei su DNR sąveikaujančių (pagal jaučio DNazę I) aminorūgščių Asn94, Arg126, His149, Asn191, Tyr228, His273 pozicijos kartu su aminorūgščių rišančių Mg^{2+} (Asn32, Glu61) pozicijomis yra konservatyvios. Tuo tarpu kitos paviršinės aminorūgštys yra nekonservatyvios ir tai leido, vystantis DNazei TA ir adaptuojantis prie didelės joninės jėgos, baltymo paviršiuje kaupti neigiamo krūvio aminorūgštis. Šio proceso rezultatas – didelės neigiamo paviršiaus potencialo sritys. Kaip tai suderinti su galimai apsunkinama sąveika su neigiamo krūvio DNR? Labai tikėtina, kad veikia du mechanizmai. Pirmiausia, paviršiaus elektrostatiškai neigiamos sritys (šoninių grupių karboksilatai) gali rištis su katijonais taip jas neutralizuojant ir įgalinant sąveiką su DNR (DNazei TA reikia didesnių katijonų koncentracijų nei eukariotinės DNazės I atveju, žr. 3.3 pav.). Antras mechanizmas – DNazinio domeno sąveikos su DNR „trikdžių“ dėl besikaupiančių neigiamų krūvių kompensacija papildomu DNR rišančiu C-galiniu domenu. Eksperimentiniai duomenys leidžia spręsti, kad būtent jis *Thioalkalivibrio sp. K90mix* DNazės atveju leidžia vykdyti DNaziniam domenui DNR hidrolizę esant didelėms druskos koncentracijoms.

Kaip jau aptarta, galima analogiška adaptacija prie joninės jėgos, kuomet prie DNazinio domeno natūralioji atranka prilieja DNR rišančius domenus, yra stebima ir kitų druskingumui pakančių prokariotinių DNazių atvejais. Literatūroje yra aprašyti atvejai, kuomet panašus principas buvo

naudojamas tikslingai keičiant DNR polimerazės savybes. Prie polimerazinio domeno buvo prilietas HhH motyvą turintis DNR surišimo domenas iš topoizomerazės V [58, 59]. Literatūroje nepavyko aptikti aprašytų mėginimų analogiškai pasielgti su eukariotine DNaze ir priliesti prie jos DNR rišantį motyvą. Galbūt „mėgdžiojant“ gamtą ir priliejančią prie DNazės su DNR sąveikaujantį domeną pavyktų padidinti eukariotinės DNazės atsparumą joninei jėgai? Bandytas tai daryti ir aprašomas tolimesnėse darbo dalyse.

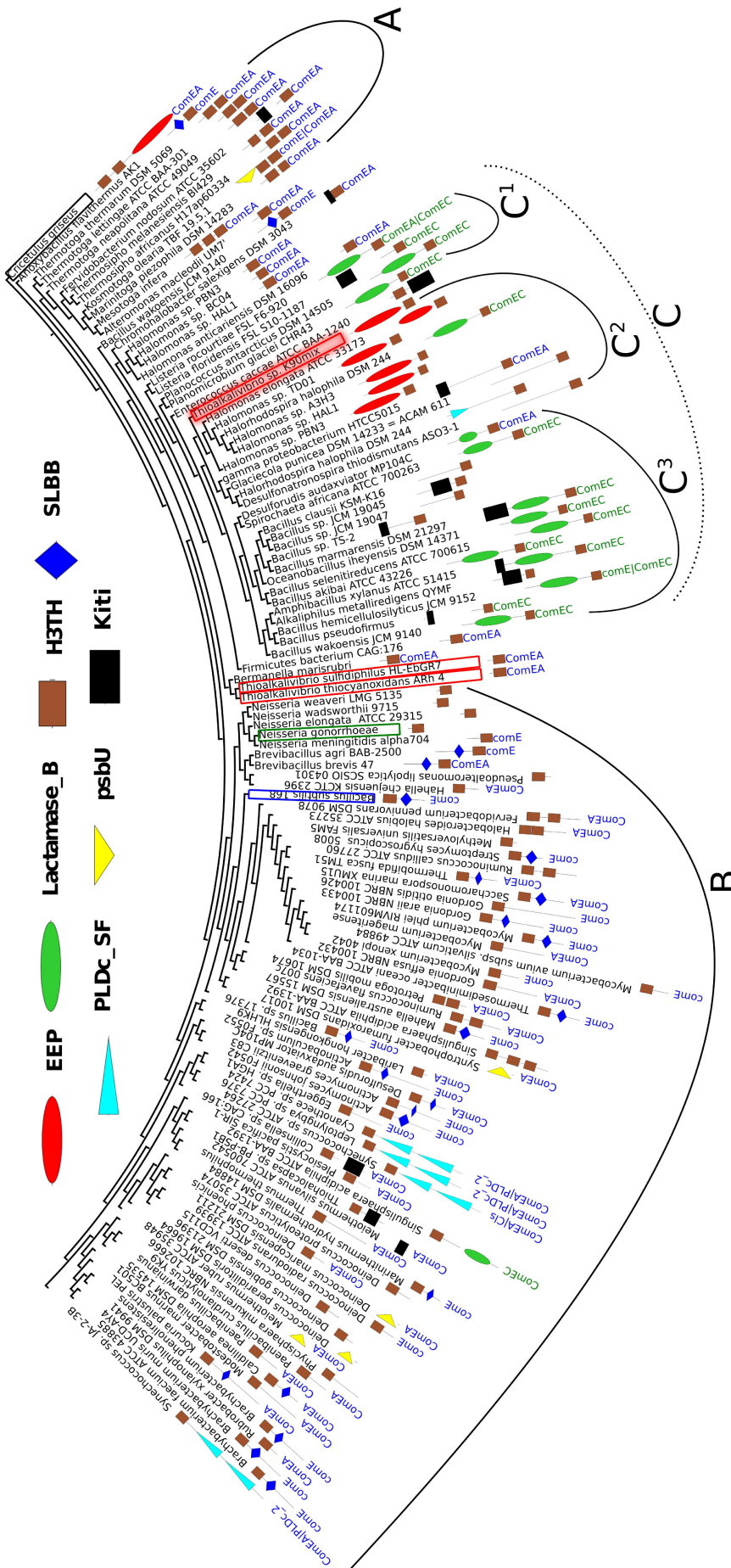
3.11. Jaučio DNazės I racionalus dizainas

Remiantis DNazės TA domenine struktūra buvo sukurti analogiški eukariotinės DNazės I liejiniai ir įvertintas jų pakantumas joninei jėgai.

3.11.1. DNazės TA C-galinio domeno homologų analizė

Buvo norima imituoti gamtos atliktą „inžineriją“, vykusią išsivystant DNazei TA ir į ją panašioms nukleazėms, ir padidinti DNazės I atsparumą joninei jėgai. DNazės TA atveju DNR rišantis domenas veikiant natūraliai atrankai buvo prilietas prie į eukariotinę DNazę I panašaus domeno. Pirmiausia buvo tirta DNazės TA C-galinio domeno kilmė siekiant parinkti DNR rišančius domenus suliejimui su jaučio DNaze I. Gautas filogenetinis medis pateiktas 3.6 pav. Visi analizuoti baltymai turi domeną su dviem HhH motyvais, kurie CDD v3.12 duomenų bazėje [98]) priskiriami prie H3TH_StructSpec-5'-nucleases superšeimai (H3TH).

Kaip minėta literatūrinėje analizėje, H3TH ir HhH motyvai yra homologiškai ir daugelis jų baltymų H3TH_StructSpec-5'-nucleases superšeimoje turi dvigubo HhH motyvo domenus [98]. Ties gauto filogenetinio medžio (3.6 pav.) pagrindu yra grupė baltymų, kurie turi po keletą H3TH domenu iš *Thermotogae* tipo ir atitinka daugiadomeninį taikinį (angl. *hit*) ComEA CDD v3.12 duomenų bazėje [98]). Šią grupę 3.6 pav. žymi „A“. Visi kiti analizuoti baltymai atsišakoja nuo seserinės grupės (angl. *sister group*).



3.6 pav. Dvigubą HhH motyvą turinčio domeno, kuris randamas DNazėje iš *Thioalkalibacillus sp. K90mia*, homologų filogenetinis medis. Domeninė architektūra pavaizduota remiantis paieška CDD v3.12 [98] duomenų bazėje. Schemoje naudojami šios duomenų bazės trumpiniai, išskyrus „H3TH_StructSpec-5'-nucleases“, kuris sutrumpintas iki H3TH. Domenai, kurie buvo aptikti tik 1 kartą, yra apjungti į grupę žymimą kaip „Other“. Raudonos elipsės žymi nukleazinį domeną su dviem HhH motyvais (H3TH), žalia elipsė – β -laktamazės domeną. Raudonas rėmelis žymi *Thioalkalibacillus* genties baltymus. Rausvas kvadratas žymi DNazę iš *Thioalkalibacillus sp. K90mia*, kuri buvo eksperimentiškai charakterizuota šiame darbe. Mėlynas ir žalias rėmeliai žymi bakterinės kompetencijos baltymus kurie buvo charakterizuoti kitų tyrėjų [53, 181].

Ši grupė, sekant kilmės linija iki DNazės TA, toliau skyla į dvi seserines grupes „B“ ir „C“. „B“ grupėje yra du eksperimentiškai charakterizuoti bakterijų kompetencijos baltymai: i) ComE iš *Neisseria gonorrhoeae* [181], kuris turi vieną H3TH domeną; ii) ComEA iš *Bacillus subtilis* [53], kuris pagal CDD v3.12 [98] yra sudarytas iš SLBB superšeimoms domeno ir vieno H3TH domeno. Be šių baltymų „B“ grupėje yra daugybė baltymų turinčių įvairius domenų greta H3TH. Ties grupės „C“ pagrindu aptinkame baltymus, turinčius vieną H3TH domeną iš *Thioalkalivibrio* ir *Halomonas* genčių. Tikėtina, kad tai yra kompetencijos sistemos baltymai, panašūs į ComE iš *Neisseria gonorrhoeae*). Nuo šių baltymų, sekant filogenezinę liniją iki DNazės TA, sutinkame baltymus iš *Bacillales* būrio (3.6 C¹ pav.), kurie turi H3TH domeną prilietą prie metallo- β -laktamazės superšeimoms (Lactamase_B, CDD v3.12 [98]). Žemiau šie baltymai yra vadinami β -laktamazės-H3TH baltymais. Toliau sekant filogenetinę liniją link DNazės TA galime išskirti dvi seserines grupes: i) vienoje iš jų (3.6 C³ pav.) yra β -laktamazės-H3TH baltymai iš *Bacillaceae* šeimos ; ii) kitoje (3.6 C² pav.) yra DNazė TA ir kiti baltymai turintys tokią pačią domeninę organizaciją (EEP ir H3TH superšeimoms domenai pagal CDD v3.12 [98]). Pastarojoje grupėje (3.6 C² pav.) be nukleazinių turinčių H3TH domeną (tame tarpe DNazė TA), aptinkame ir vieną β -laktamazės-H3TH baltymą, kurio H3TH domenas yra artimesnis homologiškam domenui minėtose nukleazėse nei homologiškam domenui kituose β -laktamazės-H3TH baltymuose.

Taigi, labai tikėtina, kad evoliucijos eigoje H3TH domenas kilo iš su bakterine kompetencija susijusių baltymų ir buvo įjungtas į β -laktamazės-H3TH baltymus, o šie baltymai savo ruožtu „perdavė“ DNR rišantį domeną bakterinėms DNazėms (tame tarpe ir DNazei TA).

β -laktamazės domeno galimybė katalizuoti DNR hidrolizę buvo pademonstruota eksperimentiškai [182–184]. Taigi yra tikėtina, kad β -laktamazės-H3TH baltymuose β -laktamazės domenas katalizuoja DNR hidrolizę, o H3TH DNR rišantis domenas palengvina/sustiprina sąveiką su DNR – pa-

našiai kaip DNazės TA atveju. Kininio žiurkėno baltymas, kuris buvo naudojamas kaip išorinės grupės atstovas šaknies parinkimui filogenetiniame medyje (3.6 pav.), yra kitas galimos evoliucinės konvergencijos pavyzdys: šis baltymas sudarytas iš EEP domeno ir dviejų H3TH domenu, o DNazė TA turi vienu H3TH domenu mažiau. Taigi evoliucijos eigoje keletą kartų DNR rišantis domenas buvo sulietas su skirtingų tipų domenais, galimai katalizuojančiais DNR hidrolizę.

Atlikta filogenetinė analizė parodė, kad dvigubo HhH motyvo domenas, esantis DNazėje TA, kilo iš baltymų, susijusių su bakterinės kompetencijos mechanizmu. Kaip jau minėta aukščiau, gautame filogenetiniame medyje yra įtraukti du eksperimentiškai analizuoti tokie baltymai. Iš jų buvo pasirinktas baltymas ComEA iš *B. subtilis* kaip dvigubą HhH motyvą turinčio domeno „donoras“. Šis baltymas pasirinktas dėl to, kad jis yra sudarytas iš dviejų domenu ir saito, kurį galima panaudoti konstruojant DNR rišančio domeno ir DNazės I liejinį. Atitinkamas liejinys žymimas DNazė BS, o prielietas domenas – BS. Kitas DNR rišančio domeno „donoras“ eukariotinei DNazei I buvo parinkta DNazė TA. Atitinkamas liejinys žymimas DNazė DT, o prielietas domenas – DT. Sekančiame skyrelyje aptarsime, kaip buvo parinktos konkrečios šių dviejų chimerinių baltymų sekos.

3.11.2. DNazės I liejinių sekų parinkimas

Tinkamų saitų parinkimas yra komplikuoatas uždavinys kuriant baltymų liejinius ir paprastai reikia išbandyti daug skirtingos aminorūgščių sekos bei ilgio variantų. Aptariamam atveju buvo galima racionaliai parinkti saitines sekas, nes abu pasirinkti domenai yra iš baltymų, kurie yra multidomeniniai. Šiuose baltymuose tarp DNR rišančių C-galinių (HhH)₂ domenu N-galinės dalies ir N-galinių domenu yra natūralūs saitai. Buvo nuspręsta juos ir naudoti chimerinėms DNazėms.

Parentant konkrečias saitines sekas pagrindinis uždavinys buvo tinkamai parinkti konkrečią poziciją DNazėje TA (liejinys DNazė DT) bei

DNazėI DNazėTA ComEA	1 1 1	-----L MMHLLRRGAFAILLIVLLPSAALADL MNNLN-----	L LRLASWNIQHLGWNVGKD -----QHKKA ILAA SAAVFTA IMIFLATGKNKE	46 66 34
DNazėI DNazėTA ComEA	47 67 35	AVGKLLDYLNQDDPNTYHYVVS EPLGRNSYKERYLFLFRPNKVS VLDTYQYDDGCESCGNDSFS RPAVVK117 GYRLLRDTLEDATGAEMSVLYSD ALGRNTYREKYAFILWREAAVE YVGGALTYID-----EADRFAR EFPFSAV133 PVKQAVPTETENTVVK-----Q EANNDESNETIVIDIKGAVQHP GVYEMRTGD-----82		
DNazėI DNazėTA ComEA	118 134 83	FSSHSTKVKEEFAIVALHSA -----P SDAVAEINSLY -----D VYLDVQQKH LNDV MLMGDFNADCSYVTS SQW181 FRSRGT-DQHF LAA TVHIT YGD RVADR VEEIEAL RRYWD MLAD VME PYA GERIL FGDF NLPP HH-----D GW199 -----R VS-----Q A TEK AGGT SE-----96		
DNazėI DNazėTA ComEA	182 200 97	SSIRLRTSSSTFQWLI PDSADTTATSTNCA YDRIVVAG SLL-----Q SSVVP GSAAP FDFO AA YGL SNEM ALA248 ASMR AVAE PLVTE GAT-TL STHDR RYAN LYDN LWVP KDH TLP LIG DAG ILPE FV LSE VTG VY WD HEK AR DR269 -----Q A D E A Q V N L A E I108		
DNazėI DNazėTA ComEA	249 270 109	ISDHY PVE VTIT -----E IAD QEAG CID LNR ASV SELT ALPH IGEA RAEA IKD GRP -----W N332 LQD GT VVY IPK KGE ETA VVO QG GG SVO SDG GK GAL VN INT AT LLE ELOG ISS GV GPK AE AII AY REE NG RF O179		
DNazėI DNazėTA ComEA	333 180	AVRDLKEIRGIGAGRL EEIKARG EACIEP -----T IED ITK VSG IG EKS PEK IK SSIT TVK -----361 205		

3.7 pav. Liejinių sekų parinkimas. Sekos palyginime yra pažymėtos taip: DNazė I – jaučio DNazė I (išskyrus N-galinių sekrecijos signalą), DNazė TA – DNazė iš *Thioalkalivorio sp. K90mia*, ComEA – kompetencijos baltymas iš *Bacillus subtilis*. Fono spalvos žymni CDD v3.12 [98] superšeimui (angl. *superfamily*) domenais: raudona spalva žymni nukleazinių domeną (EEP superšeima, prieigos kodas c100490 [98]), juoda spalva žymni sritį, kuri atitinka tirpy ligandą surišantį domeną (angl. *soluble ligand binding domain*) (SLBB superšeima, prieigos kodas c14799 [98]), violetinė spalva atitinka DNR rišančių domeną su dviem HhH motyvais (H3TH superšeima, prieigos kodas c14815 [98]). Žalias rėmelis žymni fragmentus iš DNazės TA ir ComEA, kurie buvo prijungti prie jaučio DNazės C-galo. Geltonas ir mėlynas ovalai žymni tekste aptariamais amino rūgšties.

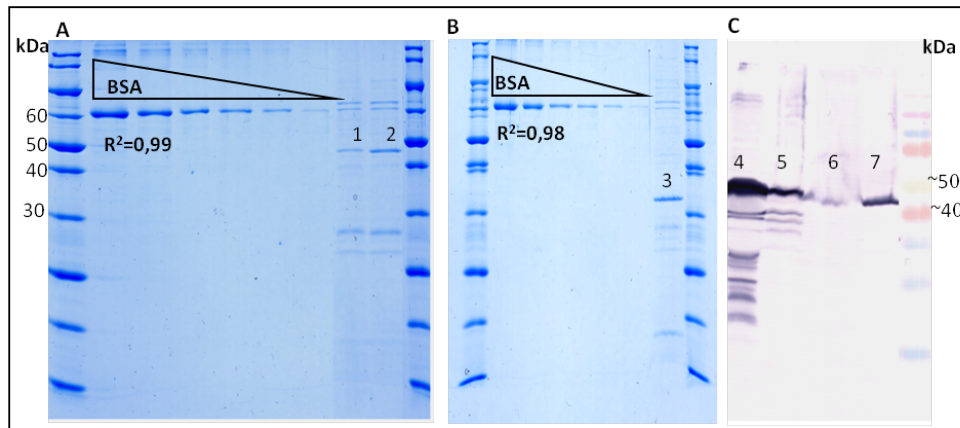
ComEA (liejinys DNazė BS) baltyme iš *Bacillus subtilis*, nuo kurios link C-galo einančios sekos fragmentą (natūralią saitinę seką su (HhH)₂ domenu) būtų galima tiesiog priliesti prie jaučio DNazės I C-galo. Tai buvo atlikta remiantis sekų palyginimu, pateiktu 3.7 pav.

Kaip akivaizdu iš jau aptartų eksperimentinių duomenų, natūralus saitas aptinkamas DNazėje TA leidžia DNaziniam bei (HhH)₂ domenams tinkamai susivynioti ir nukleaziniam domenui vykdyti katalizę. Taigi konstruojant analogišką liejinį su jaučio DNazės domenu saito ilgį parinkti galima remiantis DNaze TA. Parinkta pozicija DNazės TA sekoje, nuo kurios dalis link C-galo buvo įtraukta į liejinį DNazė DT (3.7 pav.), yra viena aminorūgštimi arčiau C-galo nei DNazinio domeno riba. Buvo nuspręsta nekeisti šio treonino (mėlynas ovalas 3.7 pav.) į atitinkamą DNazės TA aminorūgštį (glutamata), nes remiantis jaučio DNazės kristalografine struktūra [15], C-galinė aminorūgštis T260 vandenilniais ryšiais sąveikauja su atokiai sekoje esančiomis aminorūgštimis V125 bei S224 (analizė naudojant PyMOL [185]) ir jos pakeitimas glutamatu galėtų sutrukdyti tinkamam baltymo susivyniojimui.

Fragmento iš *Bacillus subtilis* ComEA baltymo pasirinkimas liejinio (DNazė BS) konstravimui taip pat pateiktas 3.7 pav. ComEA baltymą sudaro du domenai: vienas iš jų yra dvigubo HhH motyvo domenas, o kitas – SLBB superšeimos domenas ([98], CDD v3.12). Remiantis literatūros duomenimis, pastarasis domenas turėtų būti atsakingas už šio DNR receptoriaus įtvirtinimą bakterijos sienelėje [53]. Taigi stebimas natūralus saitas tarp šių domenų turėtų būti pakankamo ilgio, kuris leistų jiems tinkamai susivynioti ir jį galima panaudoti konstruojant DNazę BS. Šiame baltyme nėra DNazinio domeno, taigi tinkamas saito ilgio konstruojant liejinį DNazę BS buvo galima gauti analizuojant bendrą ComEA, DNazės I bei DNazės TA sekų palyginį (3.7 pav.). Liejinio DNazės DT atveju saitinė sritis tarp DNazinio bei (HhH)₂ domenų buvo 19 aminorūgščių ilgio, DNazės BS atveju saitas parinktas 1 aminorūgštimi trumpesnis – norėta

išvengti didelės aminorūgšties lizino (geltonas ovalas 3.7 pav.) įtraukimo į saitą.

3.11.3. DNazės I liejinių gryninimas



3.8 pav. Jaučio DNazės I liejinių bei jaučio DNazės I preparatų gautų gryninant per Ni^{2+} - NTA kolonėlę SDS - PAGE (A, B) bei Western Blot analizės (C). 1 – jaučio DNazės I liejinys (DNazė DT) su dvigubą HhH motyvą turinčiu domenu iš DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*, 2 – jaučio DNazės I liejinys (DNazė BS) su dvigubą HhH motyvą turinčiu domenu iš *Bacillus subtilis* ComEA baltymo, 3 – jaučio DNazė I. Western Blot analizės (antikūniai prieš His_6 žymenį) : 4 – DNazė DT iš netirpios frakcijos, 5 – DNazė DT iš tirpios, 6 – DNazė BS iš netirpios frakcijos, 7 – DNazė BS iš tirpios.

Sukonstruoti jaučio DNazės I ir $(\text{HhH})_2$ turinčių motyvų liejiniai DNazė DT ir DNazė BS buvo klonuoti ir ekspresuoti *E. coli*. Pavyko gauti pakankamą kiekį tirpaus baltymo liejinių savybių įvertinimui. Gautų preparatų SDS-PAGE elektroforegramos pateiktos 3.8 pav. Vertinant analizuojamų baltymų savybes, jų koncentracijos preparatuose buvo nustatytos atliekant densitometrinę analizę.

3.11.4. DNazės liejinių atsparumo joninei jėgai vertinimas

Taikant tam tikrus molekulinės biologijos metodus reikia hidrolizuoti DNR buferiuose, kuriuose yra pridėta druskų. Kartais naudojama itin didelės joninės jėgos buferiai, pavyzdžiui, hidrolizuojant DNR priemaišas RNR gryninimo metu didelė joninė jėga neleidžia veikti RNazėms. Tai, gi, pirmiausia ir buvo ištirtas gautų liejinių gebėjimas hidrolizuoti DNR

3.5 lentelė. Radioaktyvaus trumpo substrato (16 bp) hidrolizės puslaikis nustatytas jaučio DNazei I bei jos liejiniam DNazei DT ir DNazei BS.

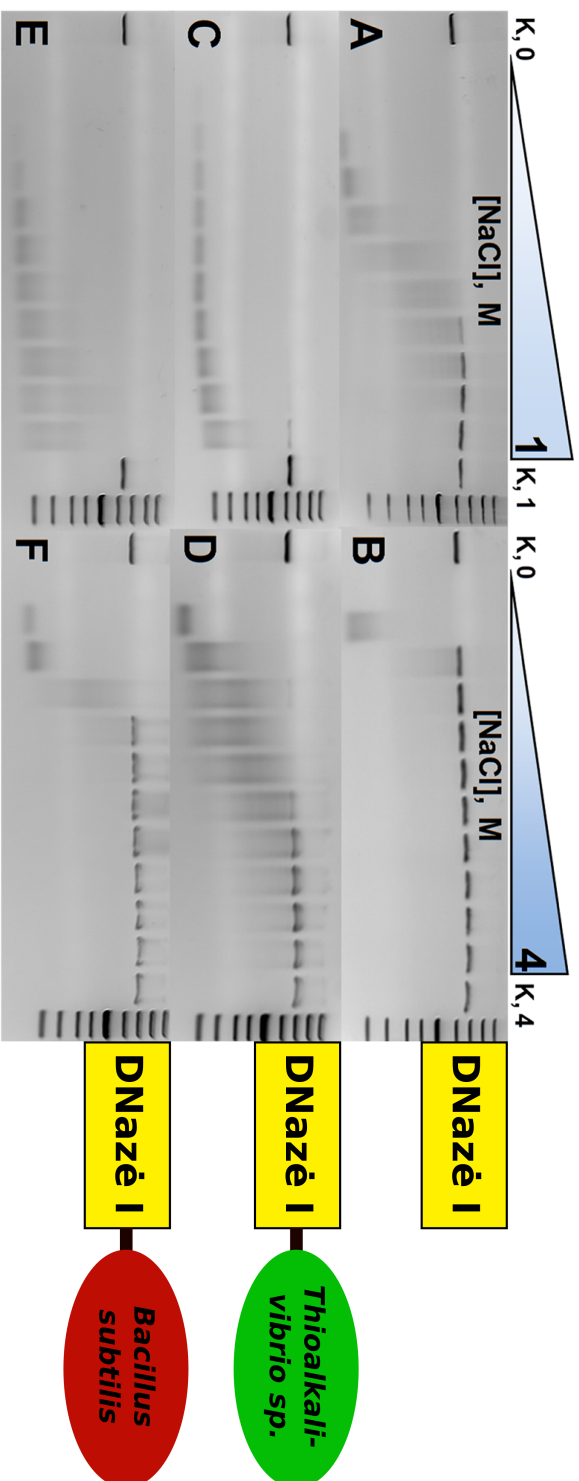
	DNazė I	DNazė DT	DNazė BS
NaCl, M	Substrato karpymo puslaikis $T_{1/2, \text{min}}$		
0	0,61	0,41	0,70
0,5	732,7 ¹	64,41	448,6 ¹
1,2	ND ²	ND ²	ND ²
4,0	ND ²	ND ²	ND ²

¹ND – prognozuojama vertė (eksperimento trukmė mažesnė nei puslaikis).

²ND – DNR hidrolizė nedetektuojama

substratus įvairios joninės jėgos buferiuose. Buvo vertinama dviejų DNR substratų hidrolizė. Plačiame joninės jėgos intervale buvo tiriamas gebėjimas hidrolizuoti: i) ilgą plazmidinę DNR (3.9 pav.), ii) radioaktyvų 16 bp substratą (3.5 lent.).

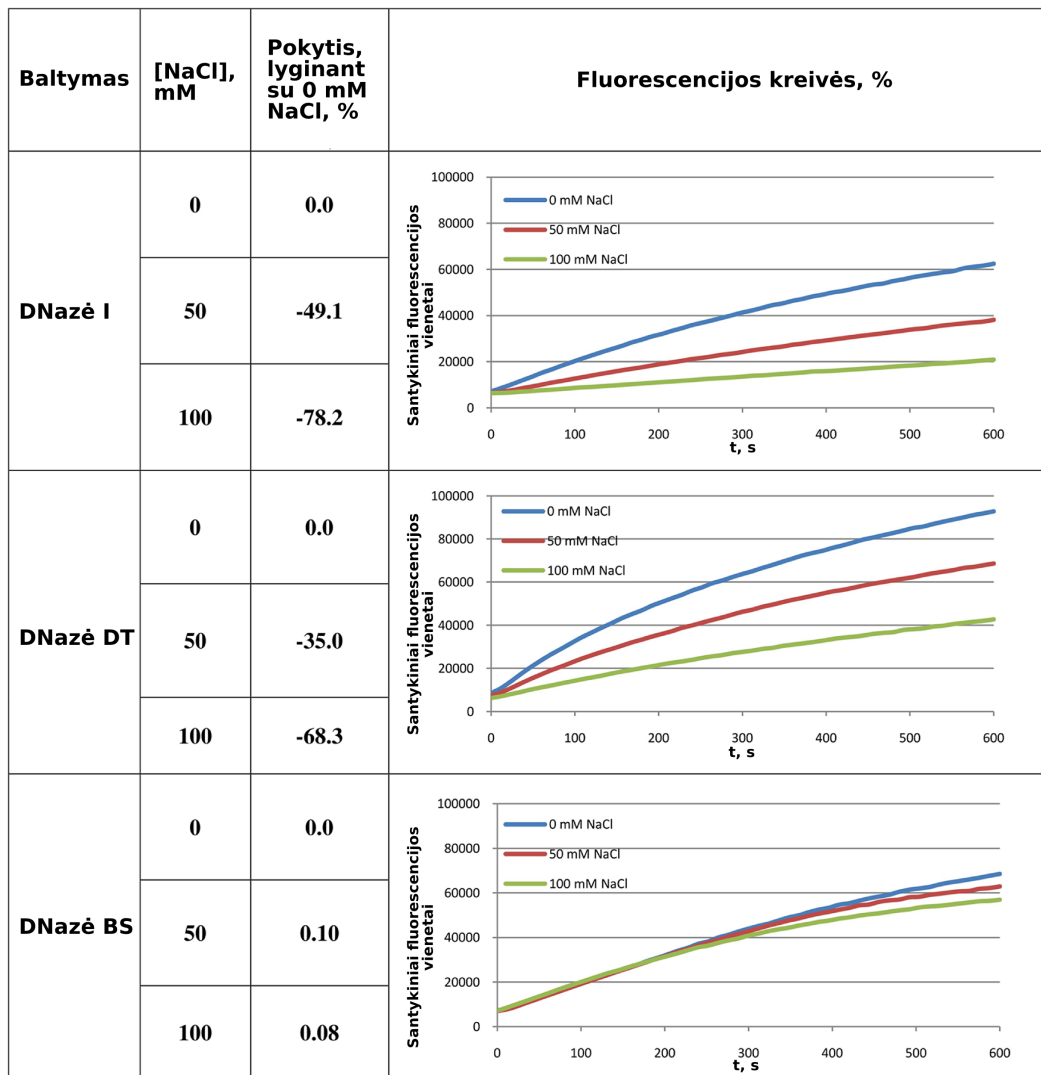
Analizuojant radioaktyvaus trumpo substrato hidrolizės duomenis (3.5 lent.) matome, kad tik liejinio DNazės DT atveju stebimas akivaizdus atsparumo didelei joninei jėgai padidėjimas: esant 0,5 M NaCl šio domeno puslaikis yra ~11 kartų trumpesnis nei DNazės I. Tuo tarpu liejinio DNazė BS atveju atitinkamas puslaikis yra tik ~1,5 karto trumpesnis nei DNazės I. Didesnėje joninėje jėgoje, esant trumpam substratui, aktyvumai buvo itin maži ir puslaikių apskaičiuoti nebuvo galima. Daugiau informacijos suteikia duomenys pateikti 3.9 pav. Akivaizdu, kad esant 1 M NaCl koncentracijai laukinio tipo DNazė I iš esmės yra neaktyvi. Tuo tarpu liejinys DNazė TA (prilietas domenas iš itin druskingumą toleruojančio mikroorganizmo *Thioalkalivibrio sp. K90mix*) pastebimai degraduoja DNR net ir reakcijos buferyje esant 4 M NaCl. DNazė BS (domenas iš ne itin druskingumui pakantaus organizmo *Bacillus subtilis*) atveju DNR pastebimai degraduojama iki 1,6 M NaCl. Taigi DNazė DT yra aktyvesnė nei DNazė BS esant aukštoms druskos koncentracijoms.



3.9 pav. Jaučio DNazės I bei jos liejinių DNazė DT ir DNazė BS veikimas skirtingose joninėse jėgose. Elektroforegramos kairėje pusėje rodo, kaip linearinuota plazmidė karpoma nuo 0 iki 1 M NaCl, druskos koncentracijai didėjant po 0,1 M. Elektroforegramos dešinėje pusėje rodo aktyvumo kitimą nuo 0 iki 4 M NaCl, druskos koncentracijai didėjant po 0,4 M. Kontrolinės reakcijos, kuriose nebuvo deta fermento preparato, dviejose skirtingose druskos koncentracijose pažymėtos raide K.

Analizuojant DNazės BS aktyvumą mažose NaCl koncentracijose, situacija yra kitokia. Esant 200 mM NaCl koncentracijai (3.9 C, E pav.) DNazė DT DNR nesuskaldo iki galo (elektroforegramose pastebimas produktų šešėlis), o DNazė BS DNR suskaldo iki elektroforegramoje nestebimų produktų. Taigi šiuo atveju galime daryti prielaidą, kad, esant mažoms druskos koncentracijoms, DNazė BS yra aktyvesnė nei DNazė DT. Siekiant patikrinti šią prielaidą buvo atlikta liejinių aktyvumų vertinimas stebint fluoroforu žymėto duplekso hidrolizę mažos joninės jėgos sąlygomis (0, 50 ir 100 mM NaCl). Rezultatai pateikiami 3.10 pav. Kartu su fluorescencijos kreivėmis šiame paveiksle pateikiamas ir aktyvumo pokytis, stebimas esant padidintai druskos koncentracijai, palyginus su aktyvumu esant 0 mM NaCl. Remiantis gautomis fluorescencijos kreivėmis, galime teigti, kad DNazės BS aktyvumas iš esmės yra neslopinamas, kuomet NaCl koncentracija yra iki 100 mM NaCl. Tuo tarpu laukinio tipo DNazė bei DNazė DT yra ženkliai slopinamos net ir esant 50 ar 100 mM NaCl. Šiame druskos koncentracijos intervale DNazė DT yra tik šiek tiek mažiau inhibuojama joninės jėgos nei laukinio tipo DNazė I.

Taigi eksperimentiškai buvo patvirtinta prielaida, kad DNazė BS esant mažai druskos koncentracijai yra atsparesnė jos inhibuojančiam poveikiui nei DNazė DT. Kodėl taip yra, atsakyti remiantis turimais eksperimentiniais duomenimis yra gana keblu. Tam tikrų prielaidų, kodėl skiriasi DNazės BS ir DNazės DT atsparumas joninei jėgai, galime padaryti analizuodami liejiniuose panaudotų domenų kilmę. Liejinio DNazės BS C-galinis domenas yra iš ComEA baltymo (*Bacillus subtilis*), kuriame jis yra nukreiptas į ląstelės išorę ir tiesiogiai susiduria su mikroorganizmo aplinka bei veikia kaip dvigrandės DNR receptorių [52, 53]. Yra žinoma, kad *Bacillus subtilis* gali toleruoti druskingumo svyravimus, bet šis mikroorganizmas geriausia auga esant mažoms druskos koncentracijoms ir jo tipinė aplinka yra dirvožemis. Taigi šis domenas turėtų būti prisitaikęs sąveikauti su DNR esant vidutinėms ar mažoms druskos koncentracijoms. Tuo



3.10 pav. Mažos druskos koncentracijos poveikis jaučio DNazės I ir jos liejinių, turinčių dvigubo HhH motyvo domeną, aktyvumams. Aktyvumas buvo vertinamas esant trim skirtingoms NaCl koncentracijoms galutiniam reakcijos mišinyje: 0, 50, 100 mM. Aktyvumas buvo nustatomas spektrometru stebint fluoresceinu žymėto DNR duplekso (30 bp) hidrolizę. Kuomet DNazė karpė DNR, fragmentas su fluoroforu nutolsta į buferį nuo slopiklio ir stebima intensyvėjanti fluorescencija. Fluorescencija buvo registruojama kas 12 sekundžių ir kiekvienai kreivei apskaičiuojamas maksimalus fluorescencijos kitimo greitis, kuris yra proporcingas fermentiniam aktyvumui. Tokie eksperimentai buvo atliekami keičiant NaCl koncentracijas reakcijos buferyje kiekybiškai vertinant kaip aktyvumą slopina joninė jėga.

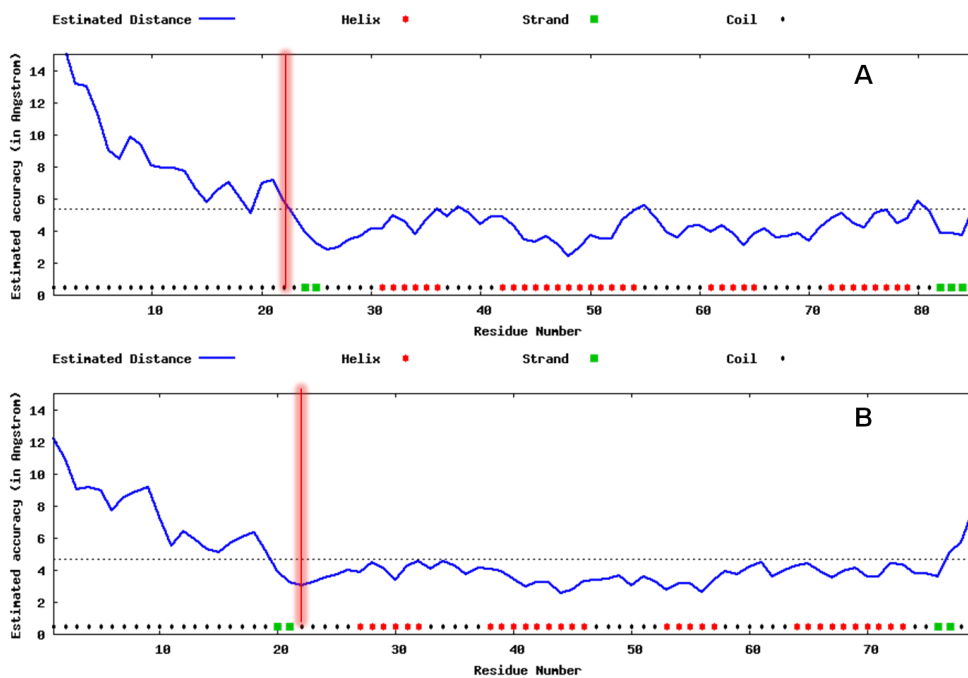
tarpu DNazės DT atveju domenas yra iš mikroorganizmo, kuris gali augti druskos koncentracijai esant net 4 M NaCl [171] ir šio mikroorganizmo tipinė aplinka yra itin druskingi ežerai. Taigi šie domenai ir turėtų būti prisitaikę sąveikauti su DNR esant atitinkamoms aplinkos sąlygoms. Tai paaiškina, kodėl liejinys DNazė DT yra ženkliai atsparesnė didelei joninei jėgai nei liejinys DNazė BS.

3.12. Domenų, kurie naudoti kuriant DNazės I liejinius, struktūros modeliavimas ir analizė

Eksperimentiniais metodais ištyrus du liejinius paaiškėjo, kad liejinys DNazė DT yra ženkliai atsparesnis didelei joninei jėgai, nei liejinys DNazė BS. Tai nėra netikėtas rezultatas, nes, kaip jau aptarta, DNazės BS atveju prielietas dvigubo HhH motyvo domenas yra iš išskirtiniu pakantumu druskingumui nepasižyminčio mikroorganizmo *Bacillus subtilis* genomo. Tuo tarpu DNazės DT atveju atitinkamas domenas yra kilęs iš ekstremaliai joninei jėgai pakantaus mikroorganizmo *Thioalkalivibrio sp. K90mix*. Tačiau tai nepaaiškina mechanizmo, lemiančio skirtingą šių liejinių atsparumą joninei jėgai. Koks yra esminis skirtumas tarp šių dviejų HhH dvigubą motyvą turinčių domenų? Tai išsiaiškinti bus bandoma šiame skyriuje.

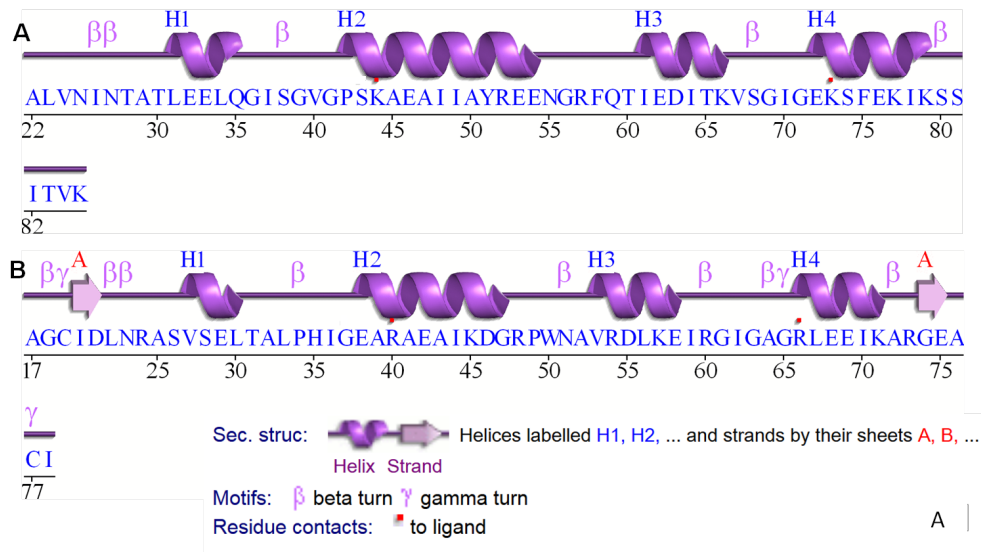
3.12.1. Struktūrų modeliavimas

Abiejų domenų erdvinės struktūros buvo sumodeliuotos naudojanti I-Tasser 3.0 programiniu paketu. Kartu su domeno seka buvo modeliuojamas ir atitinkamas saitas. 3.11 pav. pateikti gautų modelių tikslumo profiliai (iš I-Tasser 3.0 ataskaitos). Viršutinis grafikas atitinka DNazės BS C-galinį domeną, grafikas apačioje – DNazės DT C-galinį domeną. Punktyrinė horizontali linija žymi ribinę patikimumo vertę. Ją viršijant, atitinkamos sekos fragmento modeliu pasitikėti negalima. Kaip matome, N-galiniai fragmentai yra sumodeliuoti nepatikimai. To ir buvo galima tikėtis, nes šie fragmentai atitinka saitines sekas, kurios liejiniuose HhH



3.11 pav. Gautų struktūrinių modelių tikėtinas tikslumas. Tikėtino tikslumo grafikai gauti I-Tasser 3.0 programa [86] atliekant struktūrų modeliavimą. Buvo modeliuoti du domenai, naudoti liejiniamis konstruoti, kartu su atitinkančiomis tarpdomeninėmis sritimis. Profilis, atitinkantis domeną iš *Bacillus Subtilis*, yra pateiktas viršuje (A). Profilis, atitinkantis domeną iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*, yra pateiktas apačioje (B). Raudona linija žymi poziciją ties kuria mažos kokybės N-galinis fragmentas buvo pašalintas iš struktūrinio modelio ir tolimesnės analizės.

3.12. Domenų, kurie naudoti kuriant DNazės I liejinius, struktūros modeliavimas ir analizė



3.12 pav. Struktūrinių modelių antrinės struktūros. Grafikai gauti su PDBsum [186]. Schema, atitinkanti domeną iš *Bacillus Subtilis*, yra pateikta viršuje (A). Schema, atitinkanti domeną iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*, yra pateikta apačioje (B).

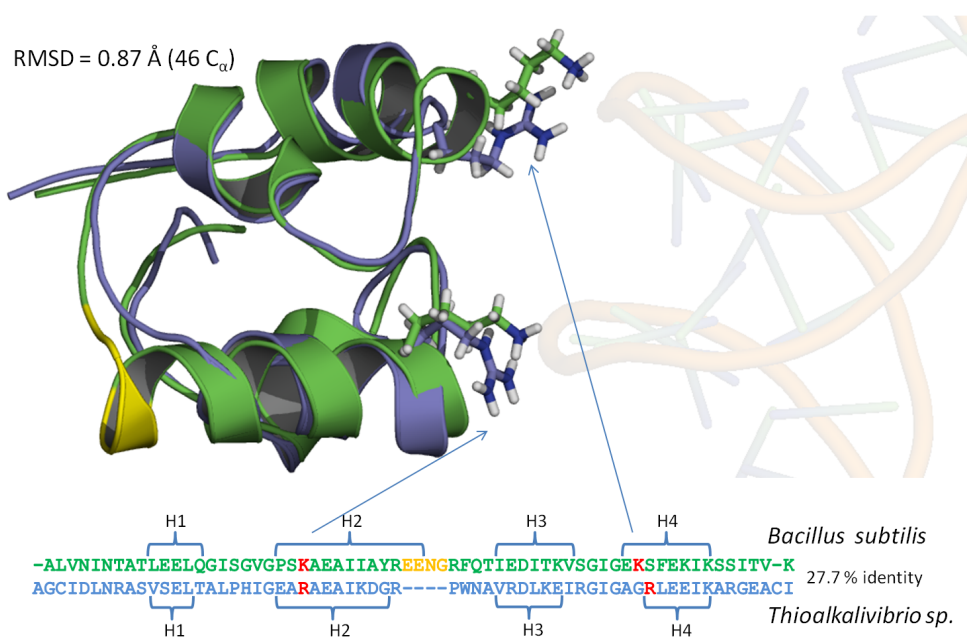
dvigubą motyvą turinčius domenų jungia su DNazės domenu. Saitinės sekos jungia baltymo domenų tarpusavyje ir dėl to neturėtų turėti specifinio joms būdingo susilankstymo (angl. *fold*) ir apibrėžtos erdvinės struktūros. Naudojantis PyMol 1.4 ir vizualiai analizuojant gautų struktūrų superpozicijas buvo parinktos N-galinių sekų sritys, kuriose abiejų modelių grandinės erdvėje suartėja ir identifikuotos atitinkamos pozicijos. Tolimesnei analizei buvo naudotos tik tos struktūrinių modelių dalys, kurios atitinka sekas link C-galo nuo minėtų pozicijų. Šios pozicijos 3.11 pav. yra pažymėtos vertikaliais raudonais brūkšniais. Tokiu būdu iš erdvinių modelių buvo pašalintos mažiausiai tikslūs sritys. Tolimesnei analizei atlikti tai buvo būtina, nes šie nekokybiškai sumodeliuoti N-galiniai fragmentai buvo greta DNR rišančio paviršiaus ir būtų trukdę analizei.

Gautų modelių antrinės struktūros pateikiamos 3.12 pav. Kaip ir buvo galima numanyti iš anksčiau pateiktų duomenų, abiejų domenų antrinė struktūra atitinka dvigubą HhH motyvą: keturi spiraliniai fragmentai, kuriuos jungia linkiai. Abiejų domenų atveju pirmo HhH motyvo (spiralė-linkis-spiralė) antras spiralinis fragmentas (H2) yra ilgiausias iš visų keturių spiralinių fragmentų. Šis domeno fragmentas *Bacillus subtilis* atveju

yra ilgesnis nei atitinkamas fragmentas iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*. Taip pat skirtumas tarp šių domenų akivaizdus antrajame HhH motyve ties antrąja spirale (H4): ji yra ilgesnė domene iš *Bacillus subtilis*, o domene iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* vietoje \sim pusės spiralinės vijos yra trumpas linkis, po kurio yra mažas β -klostės motyvas. Taigi abiejų domenų atveju du HhH pakartojimai gana ženkliai skiriasi.

Esminiai skirtumai tarp šių dviejų homologiškų domenų atsiskleidžia lyginant jų struktūras. Sumodeliuotų struktūrų superpozicija pateikiama pav. 3.13. Kartu su superpozicija pateikiama ir preliminari DNR spiralės pozicija remiantis struktūriškai panašia HhH motyvą turinčia PDB struktūra su homologiniu domenu iš kristalografinės struktūros PDB ID: 3E0D [107]. Taip pat 3.13 pav. pateikiamas ir struktūrinę superpoziciją atitinkantis sekų palyginys. Matome, kad šių dviejų domenų struktūros yra iš esmės panašios – RMSD tarp 42-jų sutapatintų C_α atomų (abi struktūros turi po ~ 60 C_α atomų) yra tik 0,87 Å. Sekos skiriasi gana ženkliai – identiškumas 28 %. Taigi, nors struktūros yra panašios, ženklūs sekos skirtumai turėtų atsispindėti struktūroje. Tai dabar ir bus aptarta.

Kaip matome, remiantis pavaizduota DNR 3.13 pav. galime išskirti aminorūgštis, kurios priartėja prie DNR fosfatų. Šios aminorūgštys 3.13 pav. pažymėtos raudona spalva sekose bei lazdelėmis struktūriniuose modeliuose. 3.12 pav. šios aminorūgštys atitinkamai žymimos raudonais taškeliais. Kaip matome, domeno iš *Bacillus subtilis* atveju tai yra du lizinai, o domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju tai yra du arginai. Remiantis 3.12 pav. matome, kad šios aminorūgštys išsidėsto pirmojo HhH motyvo antros H2 spiralės pradžioje ir antrojo HhH motyvo antros spiralės H4 pradžioje. Pirmo HhH motyvo atveju lizino (*Bacillus subtilis*) ir arginino (*Thioalkalivibrio sp. K90mix*) pozicijos sekų palyginyje ir pagrindinės grandinės fragmentai baltymo erdvinėje struktūroje sutampa. Tuo tarpu ženklūs skirtumai stebimi antrojo HhH motyvo atveju. Domeno iš *Bacillus subtilis* atveju, kaip matome iš 3.13 pav., spiralė H4 prasideda



3.13 pav. Dviejų DNR rišančių domenų, turinčių dvigubą HhH motyvą, struktūrinių modelių superpozicija ir atitinkamas sekų palyginys. Vienas domenas yra iš *Bacillus subtilis* kompetencijos baltymo ComEA, kitas domenas – iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* nukleazės. Aminorūgštys, kurių šoninės grandinės priartėja prie DNR fosfatų, struktūrose yra pavaizduotos lazdelėmis, o palyginyje – raudona spalva. Geltona spalva tiek palyginyje, tiek struktūrose žymi domeno iš *Bacillus subtilis* sritį, kuri neturi atitinkančių aminorūgščių domene iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*. Tiesiogiai su DNR sąveikaujantios aminorūgštys pavaizduotos lazdelėmis. „H“ žymi spiralinius fragmentus.

santykinai kiek arčiau N-galo nei domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju ir yra ilgesnė. Dėl to antroji su DNR sąveikaujanti teigiamai įkrauta aminorūgštis lizinas (*Bacillus subtilis*) yra arčiau N-galo (per vieną poziciją sekų palyginyje) nei atitinkamas argininas domene iš (*Thioalkalivibrio sp. K90mix*). Šis skirtumas akivaizdus tiek sekų palyginyje, tiek struktūrų erdvinėje superpozicijoje (3.13 pav.). Šis antrasis lizinas (*Bacillus subtilis*) yra pačioje H4 spiraleje, o antrasis aptariamas argininas (*Thioalkalivibrio sp. K90mix*) yra pačioje H4 spirales pradžioje – ties riba su linkiu.

Taigi lyginant dvi sumodeliuotas struktūras matome, kad skiriasi aminorūgštys, galimai sąveikaujančios su DNR, bei jų tarpusavio išsidėstymas. Taigi turėtų skirtis ir sudaromi kontaktai su DNR. Tai bus aptariama kitame skyrelyje.

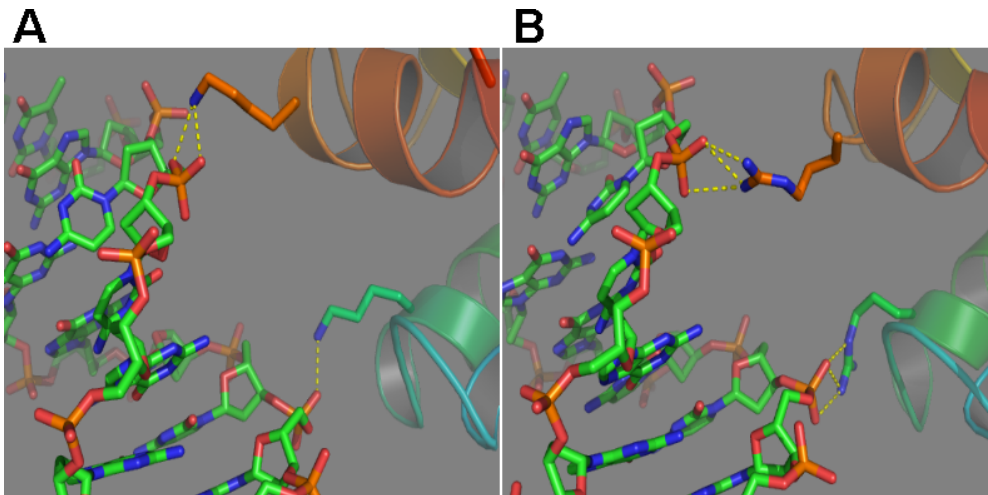
3.12.2. Sąveika su DNR

Gauti DNR bei analizuojamų dviejų dvigubus HhH motyvus turinčių domenų kompleksų su DNR modeliai leidžia detaliau pažvelgti į susidarančias sąveikas tarp baltymo bei DNR. Kaip aptarta aukščiau, naudojant vien tik „grubų“ DNR modelį galime identifikuoti esmines aminorūgštis, kurios gali sąveikauti su DNR.

Analizuojant DNR kompleksacijos modeliavimo rezultatus galime identifikuoti esminius skirtumus tarp analizuojamų dviejų domenų sąveikos su DNR. Akivaizdžiausias skirtumas yra galimos skirtingos nekovalentinės sąveikos. 3.6 lent. pateikiami galimi vandeniliniai ryšiai tarp analizuojamų baltymo domenų bei DNR. Atitinkamos erdvinės struktūros pateiktos 3.14 pav. – vandeniliniuose ryšiuose dalyvaujančios aminorūgštys vaizduojamos lazdelėmis. Kaip matome, vandenilinius ryšius sudaro tos aminorūgštys, kurios ir buvo preliminariai identifikuotos „grubiame“ modelyje (3.13 pav.). Akivaizdžiai skiriasi sudaromų vandenilinių ryšių skaičius tarp baltymo ir DNR lyginant domeną iš *Bacillus subtilis* bei domeną iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*.

3.6 lentelė. Vandeningieji ryšiai tarp dvigubą HhH motyvą turinčių domenų ir DNR, remiantis modeliavimo rezultatais. Buvo analizuoti du domenai. Vienas domenas yra iš *Bacillus subtilis* kompetencijos baltymo ComEA (*B. subtilis*), kitas – iš *Thioalkalivibrio* sp. *K90mix* nukleazės (*T. sp. K90mix*).

Kilmė	Domenas			DNR			Atstumas, Å
	Aminorūgštis nr.	Aminorūgštis	Atomas	Nukleorūgštis nr.	Nukleorūgštis	Atomas	
<i>B. subtilis</i>	44	LYS	NZ	31	ADE	O1P	2,89
	73	LYS	NZ	12	CYT	O2P	2,91
	73	LYS	NZ	12	CYT	O5'	2,94
<i>T. sp. K90mix</i>	40	ARG	NE	31	ADE	O1P	3,03
	40	ARG	NH2	31	ADE	O1P	3,02
	40	ARG	NH2	31	ADE	O2P	2,88
	66	ARG	NH1	12	CYT	O1P	3,26
	66	ARG	NH1	12	CYT	O2P	2,91
	66	ARG	NH2	12	CYT	O2P	2,91



3.14 pav. Vandeniliniai ryšiai tarp dvigubą HhH motyvą turinčių domenų ir DNR remiantis struktūriniais modeliais. Buvo analizuoti du domenai. Vienas domenas yra iš *Bacillus subtilis* kompetencijos baltymo ComEA (A), kitas – iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* nukleazės (B).

Kaip matome iš duomenų, pateiktų 3.6 lent., abiejų domenų atveju vandeniliniai ryšiai sudaromi su dviejų nukleorūgščių fosfatinėmis grupėmis. Domeno iš *Bacillus subtilis* atveju detektuojame tris galimus vandenilinius ryšius tarp DNR ir baltymo: vienas su viena fosfatine grupe ir du su kita fosfatine grupe. Domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju aptinkame iš viso šešis galimus vandenilinius ryšius – atitinkamai po tris kiekvienai fosfatinei grupei. Taigi akivaizdu, kad domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju sudaroma ženkliai daugiau vandenilinių ryšių su fosfatinėmis grupėmis nei domeno iš *Bacillus subtilis* atveju. Akivaizdi to priežastis yra tai, kad domeno iš *Bacillus subtilis* atveju, kaip vandenilinės jungties donoriai, dalyvauja du liziniai, o domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju sąveikoje dalyvauja du argininai.

Taigi vandenilinėse jungtyse dalyvaujančios dvi fosfatinės grupės domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju būtų mažiau prieinamos tirpikliui ir tirpiklyje esantiems jonams lyginant su domenu iš *Bacillus subtilis*. Argininas geba sudaryti daugiau vandenilinių ryšių, bet jie būna silpnesni nei lizino sudaromi vandeniliniai ryšiai [187]. Tačiau jis labiau nei lizinas gali pakeisti baltymo paviršiaus elektrostatinės savybės ir dalyvauti didesniame elektrostatinėse sąveikų skaičiuje dėl guanidino grupės [188]. Taigi, galbūt

arginino elektrostatinės savybės ir sąveikaujančio fosfato mažesnis prieinamumas tirpikliui lemia tai, kad domenas iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* labiau padidina DNazinio domeno atsparumą didelei joninei jėgai nei domenas iš *Bacillus subtilis*. Tai labai tikėtina, nes modelinėje sistemoje, tiriant poliargininų bei polilizinų sąveiką su DNR, [189] suardyti poliarginino ir DNR kompleksą reikėjo didesnės joninės jėgos nei polilizino atveju. Tačiau faktas, kad DT domene su DNR kontaktuoja argininai, o BS domene – lizinai pats savaime nepateikia paaiškinimo, kodėl liejinys DNazė DT yra atsparesnis didelei joninei jėgai lyginat su liejiniu DNaze BS. Vis dar lieka neaišku, kuo iš esmės skiriasi domenų DT bei BS sąveika su DNR esant didelei monovalenčių katijonų koncentracijai.

Siekiant atsakyti į šį klausimą ir buvo atliekamas elektrostatinės sąveikos tarp baltymo ir DNR modeliavimas, aptariamasis sekančiame skyrelyje.

3.12.3. Elektrostatinės sąveikos modeliavimas

Kaip aptarta aukščiau, DNazė DT pastebimai degraduoja DNR esant itin aukštai joninei jėgai (4 M NaCl), kurioje DNazė BS yra neaktyvi. Elektrostatinės sąveikos modeliavimas gali atskleisti galimus atitinkamų domenų sąveikos su DNR skirtumus. Deja, šiuo atveju susiduriame su egzistuojančių modeliavimo metodų ribotumais. Idealiu atveju domeno ir DNR sąveiką reikėtų modeliuoti esant 4 M NaCl koncentracijai. Deja, šiuo atveju didžiausią galimą modeliuoti joninę jėgą apsprendžia APBS programos bei joje realizuotos Poisson-Boltzmann teorijos ribotumas [61]. Nėra aiškios maksimalios jonų koncentracijos, kuriai esant jau negalima pasitikėti modeliavimo rezultatais – APBS autoriai rekomenduoja skaičiavimus iki 500 mM vienvalenčių jonų koncentracijos. Šiame skyrelyje pateikiami duomenys gauti naudojant dvi druskos koncentracijas: 150 mM ir 400 mM (ties patikimumo riba).

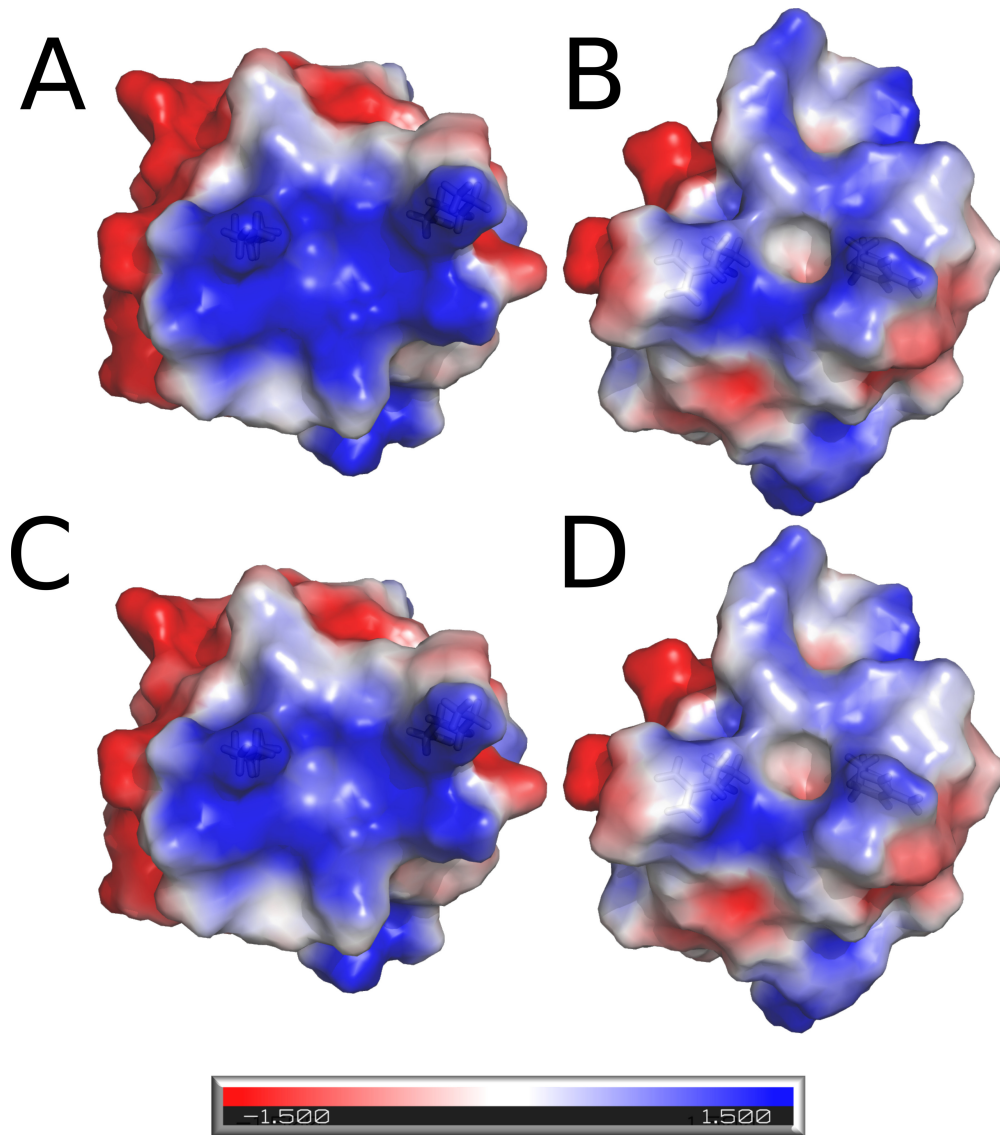
Taigi liejiniams buvo naudoti du panašūs domenai: vienas iš ekstremaliai druskingumui pakantaus mikroorganizmo *Thioalkalivibrio sp. K90mix*,

o kitas iš itin dideliu druskingumui atsparumu nepasižyminčios bakterijos *Bacillus subtilis*. Radome, kad abu domenai sąveikauja su DNR fosfatais per teigiamai įkrautas aminorūgščių šonines grandinėles. Jau nustatėme, kad argininai sukuria tankesnę vandenilinių ryšių sąveikų tinklą su DNR fosfatinėmis grupėmis ir tokiam DNR-baltymo komplekse yra numanoma mažesnis šių fosfatų prieinamumas tirpikliui. Siekiant suprasti, kaip tai gali lemti atitinkamo liejinio didesnę atsparumą joninei jėgai, buvo atlikta sumodeliuotų struktūrų elektrostatinės sąveikos analizė.

Elektrostatinės sąveikos su DNR paviršiaus potencialas šiems dviems domenams yra pavaizduotas 3.15 pav. Kaip matome, vizualiai vertinat joninė jėga neturi didelės įtakos elektrostatiniam paviršiaus potencialui. Akivaizdu, kad sąveikos su DNR paviršius domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju yra akivaizdžiai mažiau teigiamas nei atitinkamas domeno iš *Bacillus subtilis* paviršius. Tai atitinka tendencijas, stebimas daugelyje baltymų iš halofilinių / druskingumui pakančių organizmų, kuomet stebima, kad prisitaikant prie didelių druskos koncentracijų daugėja rūgštinių, neigiamą krūvį turinčių aminorūgščių liekanų [39, 42–44].

Susidarant kompleksui su DNR teigiamo krūvio aminorūgštys, kaip aprašo Fenley ir kit. [190], turi įsiterpti į DNR gaubiantį katijonų sluoksnį, išstumdami katijonus į tirpiklį. Domeno iš *Bacillus subtilis* atveju kontaktuoja su DNR karkasu lizinai, domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju – argininai. Atsižvelgiat į šį skirtumą bei skirtingą paviršiaus elektrostatinį potencialą galima kelti prielaidą, kad sąveikos su DNR metu skirtingai keičiasi jonų koncentracijos sąveikos su DNR paviršiuje.

Remiantis APBS skaičiavimo rezultatais buvo įvertinta, kaip pakinta jonų tankis, sąveikaujant analizuojamiems domenams ir DNR. Gauti rezultatai pateikiami 3.16 pav. Jonų tankio pokytis vaizduojamas izopaviršiais, kurių mato vienetas M, t.y. izopaviršius atitinka sritį, kurioje jonų koncentracija lokaliai pasikeitė vienodą molių skaičių. Paveiksle vienu metu vaizduojami keturi izopaviršiai. Izopaviršiai atitinkantys -2 ir 2

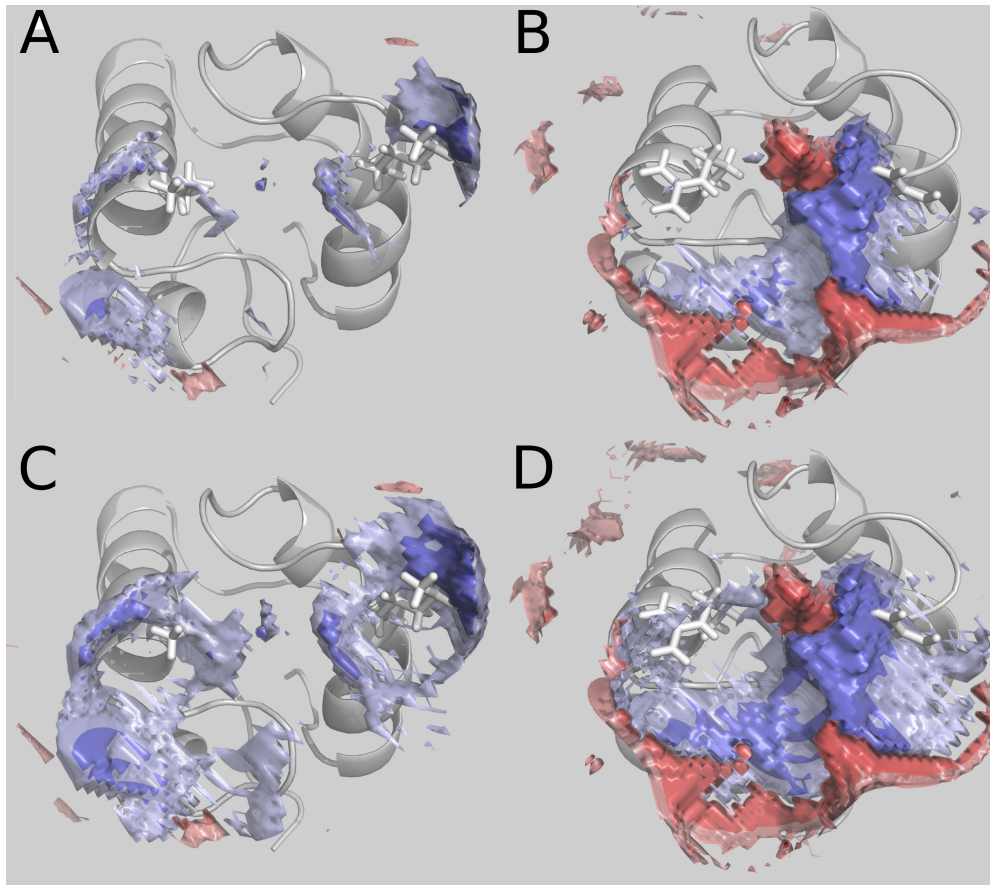


3.15 pav. DNR rišančio domeno paviršiaus, sąveikaujančio su DNR, elektrostatinis potencialas. Domeno iš *Bacillus subtilis* elektrostatinis paviršiaus potencialas yra pavaizduotas kairėje: viršutinis paveikslas atitinka 150 mM NaCl (A), apatinis – 400 mM NaCl (C). Domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju atitinkami potencialai pateikti dešinėje: viršutinis paveikslas atitinka 150 mM NaCl (B), apatinis – 400 mM NaCl (D). Mėlyna spalva atitinka teigiamą, raudona spalva – neigiamą paviršiaus potencialą intervale nuo -1,5 iki 1,5 kT/e. Paviršius yra pusiau permatomas: su DNR fosfatais sąveikaujančių dviejų aminorūgščių (lizinų – *Bacillus subtilis* atveju, argininų – *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju) šoninės grandinės vaizduojamos baltomis lazdelėmis.

M gaubia izopaviršius atitinkančius -3 ir 3 M. Pastarieji (tamsiai mėlynas ir tamsiai raudonas) yra matomi, nes juos gaubiantys izopaviršiai yra pusiau skaidrūs: lizino bei arginino, kurie sąveikauja su DNR fosfatais, šoninės grupės vaizduojamos baltomis lazdelėmis. Matome, kad, domenui sudarant kompleksą su DNR, yra sričių, kuriose jonų koncentracija sumažėja abiejų domenų atveju. Lyginant abiejų domenų atitinkamas sritis, kuriose jonų lokali koncentracija stipriai sumažėja (izopaviršius -3, tamsiai mėlynas), akivaizdu, kad domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju ši sritis yra ženkliai didesnė nei domeno iš *Bacillus subtilis* atveju. Šis skirtumas akivaizdus esant tiek 150 mM (viršutinės dalys) tiek 400 mM NaCl (apatinės dalys) koncentracijoms.

Taip pat iš duomenų, pateiktų 3.16 pav. akivaizdu, kad domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju sričių, kuriose padaugėja jonų (raudonos sritys), taip pat yra ženkliai daugiau nei kito domeno atveju. Domeno iš *Bacillus subtilis* atveju tokių sričių beveik neaptinkame. Tai yra natūralu: jeigu iš vienos vietos išstumiami jonai – jie niekur nedingsta, o turi išsidėstyti kitur stipriai padidindami lokalią koncentraciją. Taigi, domenui iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* sąveikaujant su DNR, yra ženkliai pakeičiama lokali jonų koncentracija sąveikos su DNR srityje.

Kokių jonų lokali koncentracija yra sumažinama, vykstant analizuojamų domenų sąveikai su DNR? Vizualus įrodymas, kad tai yra DNR supantys katijonai, yra pateiktas 3.17 pav. Šiame paveiksle pavaizduoti pokyčiai, kurie stebimi jonų tankyje formuojantis analizuojamų dviejų domenų ir DNR kompleksams. Baltas vielinis karkasas perteikia duomenis apie teigiamą krūvį turinčių jonų pasiskirstymą aplink DNR molekulę. Šis baltas vielinis karkasas atitinka izopaviršių ties sritimis, kur lokali teigiamo krūvio koncentracija yra $+3 Me_c$. Geltona spalva vaizduoja pokyčius jonų lokatioje koncentracijoje po komplekso susiformavimo. Geltonas izopaviršius atitinka lokalų jonų koncentracijos sumažėjimą 3 M. Ji atitinka tamsiai mėlynos spalvos izopaviršių 3.16 pav. Tik šiuo atveju izopaviršius

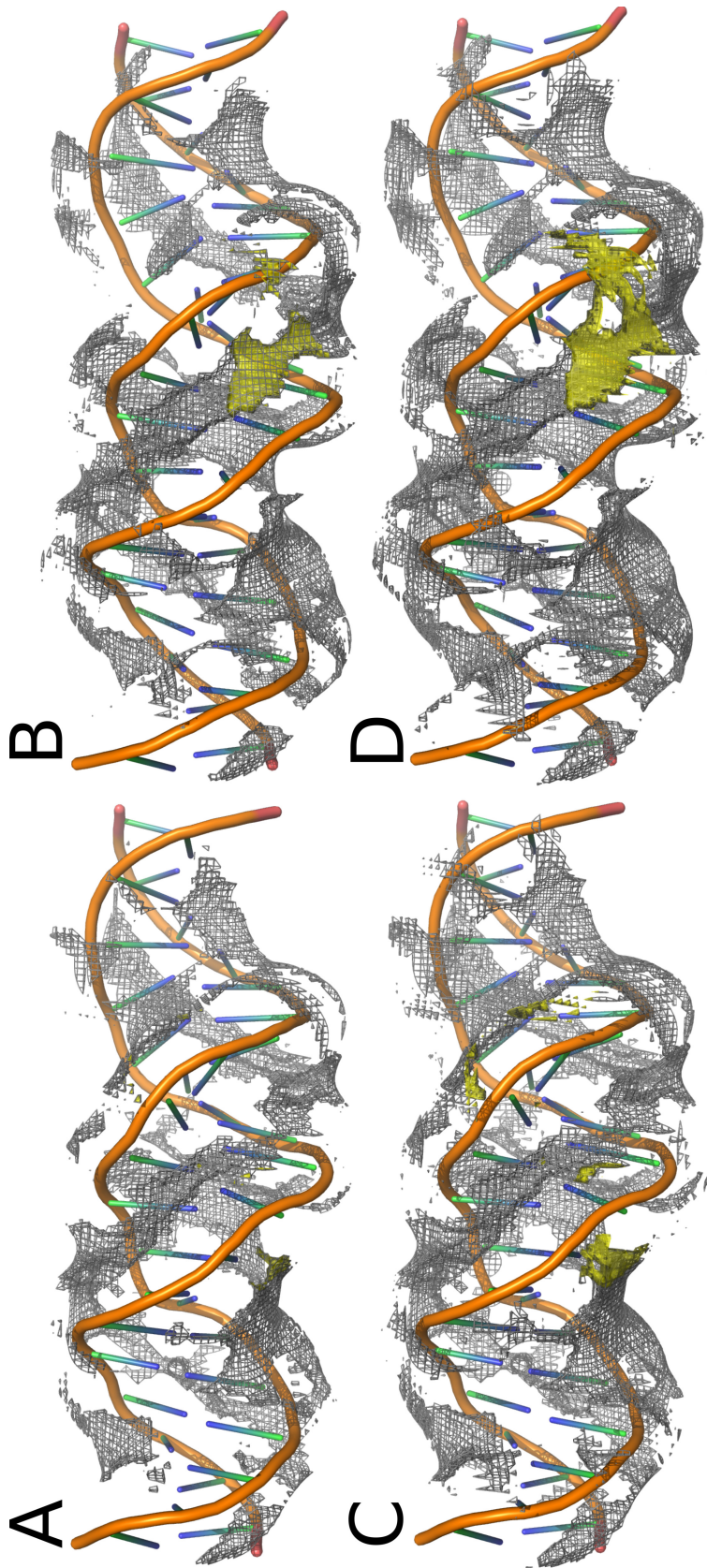


3.16 pav. DNR rišančio domeno paviršiaus, sąveikaujančio su DNR, lokalus jonų koncentracijos pokytis sąveikaujant su DNR. Domeno iš *Bacillus subtilis* atveju šis pokytis yra pavaizduotas kairėje: viršutinis paveikslas atitinka 150 mM NaCl (A), apatinis – 400 mM NaCl (C). Domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju atitinkami pokyčiai pateikti dešinėje: viršutinis paveikslas atitinka 150 mM NaCl (B), apatinis – 400 mM NaCl (D). Tamsiai mėlynos spalvos izopaviršius atitinka -3 M pokytį, šviesiai mėlynos spalvos izopaviršius – -2 M pokytį. Raudonas ir rausvas paviršiai atitinka +3 M ir +2 M pokyčius.

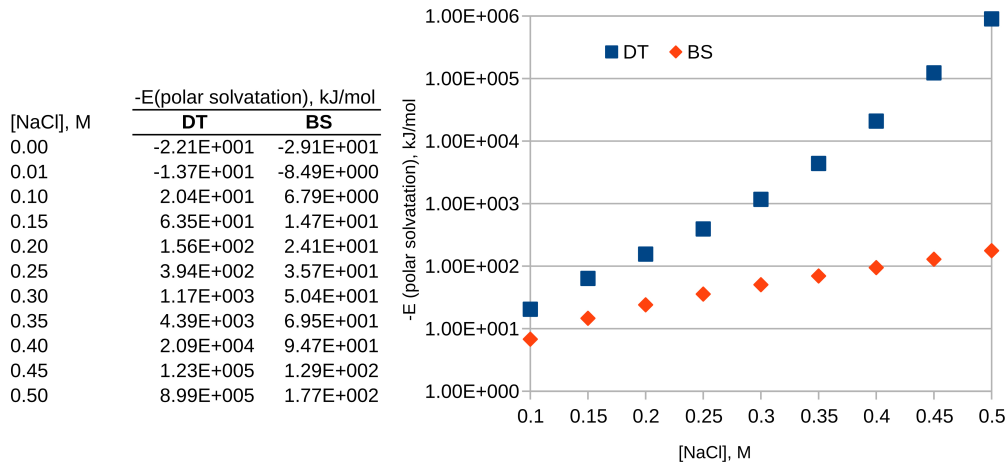
vaizduojamas iš kitos – DNR, o ne baltymo – pusės.

Matome, kad po komplekso formavimo lokali jonų koncentracija ženkliai nukrenta srityse, kuriose aplink DNR kaupiasi teigiamo krūvio jonai. Kaip matome, Na^+ koncentruojasi ties mažuoju DNR grioviu, ertmėje skiriančioje fosfatinio karkaso vijas. Molekulinės dinamikos simuliacijos taip pat parodė, kad Na^+ jonai kaupiasi mažajame griovyje [191]. Kaip matome 3.17 pav., geltonai pažymėtos sritys, kuriose sumažėja lokali jonų koncentracija formuojantis kompleksui, persidengia su vieliniu karkasu, žyminčiu teigiamų jonų pasiskirstymą aplink DNR. Tai reiškia, kad formuojantis analizuojamų domenų ir DNR kompleksams dalis Na^+ jonų, kurie kaupiasi aplink DNR, yra „nustumiami“ nuo DNR. Šie jonai, besikaupdami apie DNR fosfatus, yra tik dalinai prieinami tirpikliui – ir juos po komplekso formavimo vanduo turėtų pilnai solvatuoti. Taigi matome, kad šie du domenai ženkliai skiriasi galimybe nustumti į tirpiklį katijonus, sąveikaujant su DNR.

Kaip toks skirtingas gebėjimas keisti DNR gaubiančių katijonų sluoksnį atsispindi polinės solvatacijos dedamojoje? Pagal APBS skaičiavimo duomenis polinės solvatacijos laisvosios energijos dedamoji buvo apskaičiuota skirtingose joninėse jėgose intervale nuo 0 iki 400 mM NaCl. Gauti rezultatai pateikti 3.18 lent. Kaip matome, nesant vienvalenčių jonų solvatacijos energija yra teigiama abiejų kompleksų atveju, t.y. polinės solvatacijos aspektu susidarymas yra energetiškai nepalankus. Tuo tarpu esant monovalenčiams jonams komplekso susidarymo metu polinės solvatacijos energijos pokytis tampa neigiamas. Visose tirtose joninėse jėgose energetiškai palankesnė sąveika yra su domenais iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix*. Šio domeno atveju taip pat galime pastebėti, kad didinant joninę jėgą sąveikos energija eksponentiškai mažėja iki ekstremalių verčių. Kaip tai galima paaiškinti? Galbūt būtent šioje sistemoje taip pasireiškia Poisson-Boltzman'o teorijos trūkumai esant didelei joninei jėgai, nors kiti tyrėjai naudoja analogiškas druskos koncentracijas [68, 72]. Galbūt realiausias paaiškinimas



3.17 pav. Jonų tankio pokyčiai DNR paviršiuje po sąveikos su DNR rišančiu domenu. Kairiosios dalys atitinka sąveiką su domenu iš *Bacillus subtilis*: viršutinis kairysis paveikslas atitinka 150 mM NaCl (A), apatinis – 400 mM NaCl (C). Dešinėsios dalys atitinka sąveiką su domenu iš *Thioalkalivibrio* sp. *K90mix*: viršutinis dešinysis paveikslas atitinka 150 mM NaCl (B), apatinis – 400 mM NaCl (D). Baltas vijų tinklas vaizduoja teigiamo krūvio jonų pasiskirstymą DNR paviršiuje – atitinka +3 Me_e krūvio izopaviršių. Geltona spalva atitinka sritį, kurioje lokali jonų koncentracija, po sąveikos su DNR rišančiu domenu, sumažėjo 3 M.



3.18 pav. Polinės solvatacijos energijos pokytis formuojantis domeno ir DNR kompleksui esant skirtingoms NaCl koncentracijoms. Du domenai buvo modeliuoti: vienas iš ekstremaliai druskingumui atsparios bakterijos *Thioalkalivibrio sp. K90mix* (DT), kitas iš *Bacillus subtilis* (BS).

yra toks, kad didėjant joninei jėgai, keičiasi komplekso konformacija ir apskaičiavimams naudojant struktūrą, optimizuotą neatsižvelgiant į joninę jėgą, gaunami artefaktiniai gebėjimai nustumti katijonus nuo DNR karkaso ir pervertinamos energijos reikšmės. Taip pat, artefaktinės laisvosios energijos vertės gali būti tuomet, kai vyksta ženklūs DNR konformacijos pokyčiai, susidarant kompleksui su baltymu [72].

Kaip matome paveiksluose 3.16 bei 3.17, skirtumas tarp liejinių DNažės DT ir DNazės BS yra akivaizdus tiek mažoje, tiek didesnėje joninėje jėgoje. Tai leidžia teigti, kad domenas DT tikrai pasižymi didesniu gebėjimu nustumti katijonus nuo DNR lyginant su domenu BS.

Pagal tris joninės jėgos vertes (10, 100, 150 mM) – srityje, kurioje polinė solvatacijos energijos vertės mažėjimas yra ~ linijiniame intervale, buvo apskaičiuota SK_{teor} vertė (žr. 1.7.2 skyrelį). Domeno iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* atveju SK_{teor} buvo gauta lygi 9.6, o domeno iš *Bacillus subtilis* atveju – 3.2. Tai rodo, kad abiejų domenų afiniškumas DNR didėja, didėjant joninei jėgai – panašiai kaip ir su TATA dėžute sąveikaujančio halofilinio baltymo atveju (eksperimentinė analogiška vertė 2.1) [72].

Taigi, remiantis gautais analizuojamų dviejų domenų ir DNR modeliais, galime aiškinti, kodėl iš esmės skiriasi eksperimentiškai įvertintas DNazės

BS bei DNazės DT gebėjimas hidrolizuoti DNR esant didelei ($> 1,6$ M) NaCl koncentracijai. DNazės DT atveju domenas ir du su DNR sąveikaujantys argininai stipriau sąveikauja su DNR fosfatais nei atitinkamas DNazės BS domenas, turintis du lizinus. Dėl to, formuojantis kompleksui su DNR, šie fosfatai yra stipriau ekranuojami nuo tirpiklyje esančių jonų ir daugiau jų turėtų būti „nustumiami“ nuo DNR vykstant energetiškai palankiai jonų solvatacijai. Literatūroje aprašomas panašus atvejis, kuomet buvo eksperimentiškai analizuotos dvi polimerazės [192]. Šiame straipsnyje aprašomu atveju viena polimerazė po sąveikos su DNR į tirpiklį atpalaidavo 2-3 jonus, kita – 4-5. Ta polimerazė, kuri atpalaidavo daugiau jonų, ženkliai stipriau sąveikavo su DNR ir buvo atsparesnė joniinei jėgai. Taigi aukščiau išdėstytas paaiškinimas remiantis tik molekulinio modeliavimu dera su kitų tyrėjų eksperimentiniais duomenimis.

3.13. Galimos ateities tyrimų kryptys

Lieka neatsakyta gana daug klausimų. Teigini, kad argininai yra lemtingi įgalinant DNazės DT aktyvumą didelėje joniinėje jėgoje, patvirtinti galėtų papildomi taškinių DNazės DT bei DNazės BS mutantų tyrimai (pakeičiant argininus lizinais ir atvirkščiai). Aiškumo apie ekstremaliai didelius polinės solvatacijos įverčius domeno DT atveju bei vertingų papildomų duomenų (šiuo darbe nelygintų laisvosios energijos dedamųjų) duotų molekulinės dinamikos skaičiavimai ir trajektorijų analizė. Taip pat būtų labai įdomu atlikti nedomeninių DNazių iš druskingumui pakančių mikroorganizmų homologinį modeliavimą bei sąveikos su DNR laisvosios energijos dedamųjų analizę. Dabar dauguma literatūros, susijusios su atsparumu druskingumui, koncentruojasi ties halofiliniais fermentais, o pakantumo joniinei jėgai mechanizmai iš esmės nėra analizuojami.

Išvados

1. Papildomi su DNR sąveikaujantys C-galiniai domenai, esantys greta nukleazinio N-galinio domeno prokariotinėse DNazėse, gali būti evoliucinė adaptacija, leidžianti išlaikyti fermentinį aktyvumą didelės joninės jėgos sąlygomis. DNazės I šeimos baltymai, kuriuose nukleazinis domenas yra sulietas su dvigubą HhH motyvą turinčiu domenu, yra randami išskirtinai tik halofilinėse / druskingumui pakančiose bakterijose.
2. C-galinis su DNR sąveikaujantis domenas, turintis dvigubą HhH motyvą, yra esminis faktorius, lemiantis DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* pakantumą druskingumui.
3. DNazės iš *Thioalkalivibrio sp. K90mix* DNazinio domeno paviršiuje yra daugiau rūgštinių aminorūgščių lyginant su homologo, nepasižyminčio pakantumu druskingumui, paviršiumi. Tikėtina, kad papildomas C-galinis DNR rišantis domenas palengvino neigiamo krūvio aminorūgščių kaupimąsi sąveikos su DNR paviršiuje, evoliucijos eigoje prisitaikant prie druskingos aplinkos.
4. Dvigubo HhH motyvo domenas druskai pakančių bakterijų DNazės I šeimos baltymuose yra giminingas ComE/ComEA šeimos baltymams, susijusiems su bakterinės kompetencijos sistema. Tikėtina, kad evoliucijos eigoje šis domenas kilo iš ComE/ComEA šeimos baltymų: iš pradžių jis galėjo būti įjungtas į β -laktamazės domeną turinčius baltymus, o šie baltymai savo ruožtu galėjo „perduoti“ DNR rišantį domeną bakterinėms DNazėms.

-
5. Pavyko padidinti nepakankčios druskingumui DNazės I atsparumą joninei jėgai prilieiant dvigubo HhH motyvo domeną. Taip buvo imituotas evoliucinis žingsnis, kuomet, vykstant bakterinių DNazės I šeimos baltymų adaptacijai prie didelio druskingumo, susiliejo keli domenai.
 6. Atsparumo didelei joninei jėgai skirtumą tarp dviejų sukurtų liejinių paaiškina molekulinis modeliavimas, prognozuojantis skirtingą vandenilinių ryšių skaičių tarp priliėtų domenų ir DNR bei skirtingą gebėjimą nustumti jonus į tirpiklį, formuojantis kompleksui su DNR.

Publikacijų sąrašas

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose ISI sąrašo žurnalų moksliniuose straipsniuose:

- 1 Alzbutas, G., Kaniusaite, M., Grybauskas, A., & Lagunavicius, A. (2015). Domain organization of DNase from Thioalkalivibrio sp. provides insights into retention of activity in high salt environments. *Frontiers in microbiology*, 6.
- 2 Alzbutas, G., Kaniusaite, M., & Lagunavicius, A. (2016). Enhancement of DNaseI Salt Tolerance by Mimicking the Domain Structure of DNase from an Extremely Halotolerant Bacterium Thioalkalivibrio sp. K90mix. *PloS one*, 11(3), e0150404.

Disertacijoje pateikta medžiaga pristatyta šiose konferencijose:

- 1 Gediminas Alzbutas, Milda Kaniušaitė, Arūnas Lagunavičius, Algirdas Grybauskas. Design of Halotolerant Bovine DNase Guided By Phylogenetic and Domain Structure Studies of Bacterial DNases. 5th ICBE – International Conference on Biomolecular Engineering. USA. January 11-14 d., 2015.
- 2 Gediminas Alzbutas, Milda Kaniušaitė, Arūnas Lagunavičius, Algirdas Grybauskas. Domain organization of DNase from halophile Thioalkalivibrio sp. XIIIth International Conference of Lithuanian Biochemical Society. Lithuania. June 18-20 d., 2014.

Disertacijoje aprašytų tyrimų pagrindu pateikta tarptautinė patentinė paraiška:

- 1 Alzbutas, G., Lagunavičius, A., Kaniušaitė, M. Improved Deoxyribonuclease Enzymes. International Application No.: PCT/EP2015/062222., June 2nd, 2014.

Kitos publikacijos:

- 1 Povilaitis, T., Alzbutas, G., Sukackaite, R., Siurkus, J., & Skirgaila, R. (2016). In vitro evolution of phi29 DNA polymerase using isothermal com-

-
- partmentalized self replication technique. *Protein Engineering Design and Selection*.
- 2 Strepetkaitė, D., Alzbutas, G., Astromskas, E., Lagunavičius, A., Sabaliauskaitė, R., Arbačiauskas, K., & Lazutka, J. (2015). Analysis of DNA Methylation and Hydroxymethylation in the Genome of Crustacean *Daphnia pulex*. *Genes*, 7(1), 1.
 - 3 Glemzaite, M., Balciunaite, E., Karvelis, T., Gasiunas, G., Grusyte, M. M., Alzbutas, G., ... & Lubys, A. (2015). Targeted gene editing by transfection of in vitro reconstituted *Streptococcus thermophilus* Cas9 nuclease complex. *RNA biology*, 12(1), 1-4.
 - 4 Šulčius, S., Alzbutas, G., Kvederavičiūtė, K., Koreivienė, J., Zakrys, L., Lubys, A., & Paškauskas, R. (2015). Draft genome sequence of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* strain 2012/KM1/D3, isolated from the Curonian Lagoon (Baltic Sea). *Genome announcements*, 3(1), e01392-14.
 - 5 Baranauskas, A., Paliksa, S., Alzbutas, G., Vaitkevicius, M., Lubiene, J., Letukiene, V., ... & Skirgaila, R. (2012). Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Engineering Design and Selection*, 25(10), 657-668.

Literatūra

- [1] Moore, S. 15 Pancreatic DNase. *The enzymes*, vol. 14, (1981), pp. 281–296.
- [2] Takeshita, H.; Mogi, K.; Yasuda, T.; Nakajima, T.; Nakashima, Y.; Mori, S.; Hoshino, T.; and Kishi, K. Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 269, (2000), pp. 481–484.
- [3] Oefner, C. and Suck, D. Crystallographic refinement and structure of DNase I at 2 Å resolution. *J Mol Biol*, vol. 192, (1986), pp. 605–632.
- [4] Kienzle, N.; Young, D.; Zehntner, S.; Bushell, G.; and Sculley, T.B. DNaseI treatment is a prerequisite for the amplification of cDNA from episomal-based genes. *Biotechniques*, vol. 20, (1996), pp. 612–616.
- [5] Anderson, S. Shotgun DNA sequencing using cloned DNase I-generated fragments. *Nucleic Acids Res*, vol. 9, (1981), pp. 3015–3027.
- [6] Sambrook, J.; Russell, D.W.; and Russell, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)*, vol. 999. Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor, New York:, 2001.
- [7] Chen, W.J.; Lai, P.J.; Lai, Y.S.; Huang, P.T.; Lin, C.C.; and Liao, T.H. Probing the catalytic mechanism of bovine pancreatic deoxyribonuclease I by chemical rescue. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 352, (2007), pp. 689–696.
- [8] Drew, H.R. Structural specificities of five commonly used DNA nucleases. *J Mol Biol*, vol. 176, (1984), pp. 535–557.
- [9] Dryden, D.T. Nucleases, 2nd edn. Edited by STUART M. LINN, R., 1994.
- [10] Weston, S.A.; Lahm, A.; and Suck, D. X-ray structure of the DNase I-d(GGTATACC)₂ complex at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol*, vol. 226, (1992), pp. 1237–1256.
- [11] Suck, D. and Oefner, C. Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature*, vol. 321, (1986), pp. 620–625.
- [12] Jones, S.J.; Worrall, A.F.; and Connolly, B.A. Site-directed mutagenesis of the catalytic residues of bovine pancreatic deoxyribonuclease I. *J Mol Biol*, vol. 264, (1996), pp. 1154–1163.

- [13] Guérout, M.; Picot, D.; Abi-Ghanem, J.; Hartmann, B.; and Baaden, M. How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol*, vol. 6, (2010), p. e1001000.
- [14] Suck, D. DNA recognition by DNase I. *Journal of Molecular Recognition*, vol. 7, (1994), pp. 65–70.
- [15] Lahm, A. and Suck, D. DNase I-induced DNA conformation. 2 A structure of a DNase I-octamer complex. *J Mol Biol*, vol. 222, (1991), pp. 645–667.
- [16] Suck, D.; Lahm, A.; and Oefner, C. Structure refined to 2Å of a nicked DNA octanucleotide complex with DNase I. *Nature*, vol. 332, (1988), pp. 464–468.
- [17] Warren, M.A.; Evans, S.J.; and Connolly, B.A. Effects of non-conservative changes to tyrosine 76, a key DNA binding residue of DNase I, on phosphodiester bond cleavage and DNA hydrolysis selectivity. *Protein Eng*, vol. 10, (1997), pp. 279–283.
- [18] Doherty, A.J.; Worrall, A.F.; and Connolly, B.A. Mutagenesis of the DNA binding residues in bovine pancreatic DNase I: an investigation into the mechanism of sequence discrimination by a sequence selective nuclease. *Nucleic Acids Res*, vol. 19, (1991), pp. 6129–6132.
- [19] Hagerman, P.J. Straightening out the bends in curved DNA. *Biochim Biophys Acta*, vol. 1131, (1992), pp. 125–132.
- [20] Sutton, D.H.; Conn, G.L.; Brown, T.; and Lane, A.N. The dependence of DNase I activity on the conformation of oligodeoxynucleotides. *Biochem J*, vol. 321 (Pt 2), (1997), pp. 481–486.
- [21] Lazarovici, A.; Zhou, T.; Shafer, A.; Dantas Machado, A.C.; Riley, T.R.; Sandstrom, R.; Sabo, P.J.; Lu, Y.; Rohs, R.; Stamatoyannopoulos, J.A.; and Bussemaker, H.J. Probing DNA shape and methylation state on a genomic scale with DNase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 110, (2013), pp. 6376–6381.
- [22] Heddi, B.; Abi-Ghanem, J.; Lavigne, M.; and Hartmann, B. Sequence-dependent DNA flexibility mediates DNase I cleavage. *J Mol Biol*, vol. 395, (2010), pp. 123–133.
- [23] Price, P.A. The essential role of Ca²⁺ in the activity of bovine pancreatic deoxyribonuclease. *J Biol Chem*, vol. 250, (1975), pp. 1981–1986.
- [24] Pan, C.Q. and Lazarus, R.A. Ca²⁺-dependent activity of human DNase I and its hyperactive variants. *Protein Sci*, vol. 8, (1999), pp. 1780–1788.
- [25] Chen, C.Y.; Lu, S.C.; and Liao, T.H. The distinctive functions of the two structural calcium atoms in bovine pancreatic deoxyribonuclease. *Protein Sci*, vol. 11, (2002), pp. 659–668.

- [26] Pan, C.Q. and Lazarus, R.A. Hyperactivity of human DNase I variants. Dependence on the number of positively charged residues and concentration, length, and environment of DNA. *J Biol Chem*, vol. 273, (1998), pp. 11701–11708.
- [27] Pan, C.Q.; Ulmer, J.S.; Herzka, A.; and Lazarus, R.A. Mutational analysis of human DNase I at the DNA binding interface: implications for DNA recognition, catalysis, and metal ion dependence. *Protein Sci*, vol. 7, (1998), pp. 628–636.
- [28] Pamp, S.J.; Gjermansen, M.; and Tolker-Nielsen, T. *The Biofilm Matrix – A Sticky Framework*, pp. 37–69. Horizon BioScience, 2007.
- [29] Mann, E.E.; Rice, K.C.; Boles, B.R.; Endres, J.L.; Ranjit, D.; Chandramohan, L.; Tsang, L.H.; Smeltzer, M.S.; Horswill, A.R.; and Bayles, K.W. Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, vol. 4, (2009), p. e5822.
- [30] Whitchurch, C.B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P.C.; and Mattick, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, vol. 295, (2002), p. 1487.
- [31] Shields, R.C.; Mokhtar, N.; Ford, M.; Hall, M.J.; Burgess, J.G.; ElBadawey, M.R.; and Jakubovics, N.S. Efficacy of a marine bacterial nuclease against biofilm forming microorganisms isolated from chronic rhinosinusitis. *PLoS One*, vol. 8, (2013), p. e55339.
- [32] Nijland, R.; Hall, M.J.; and Burgess, J.G. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PLoS One*, vol. 5, (2010), p. e15668.
- [33] Mulcahy, H.; Charron-Mazenod, L.; and Lewenza, S. *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environ Microbiol*, vol. 12, (2010), pp. 1621–1629.
- [34] Kamekura, M. and Onishi, H. Properties of the halophilic nuclease of a moderate halophile, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*. *J Bacteriol*, vol. 133, (1978), pp. 59–65.
- [35] Kamekura, M. and Onishi, H. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*. *J Bacteriol*, vol. 119, (1974), pp. 339–344.
- [36] Onishi, H.; Mori, T.; Takeuchi, S.; Tani, K.; Kobayashi, T.; and Kamekura, M. Halophilic Nuclease of a Moderately Halophilic *Bacillus* sp.: Production, Purification, and Characterization. *Appl Environ Microbiol*, vol. 45, (1983), pp. 24–30.
- [37] Kanlayakrit, W.; Ikeda, T.; Tojai, S.; Rodprapakorn, M.; and Sirisansaneeyakul, S. Isolation and characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* species. *KASETSART JOURNAL*, p. 179.

- [38] Niiranen, L.; Altermark, B.; Brandsdal, B.O.; Leiros, H.K.S.; Helland, R.; Smalås, A.O.; and Willassen, N.P. Effects of salt on the kinetics and thermodynamic stability of endonuclease I from *Vibrio salmonicida* and *Vibrio cholerae*. *FEBS J*, vol. 275, (2008), pp. 1593–1605.
- [39] Eisenberg, H. Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes from extreme halophilic bacteria. *Arch Biochem Biophys*, vol. 318, (1995), pp. 1–5.
- [40] Mevarech, M.; Frolow, F.; and Gloss, L.M. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys Chem*, vol. 86, (2000), pp. 155–164.
- [41] Siglioccolo, A.; Paiardini, A.; Piscitelli, M.; and Pascarella, S. Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC structural biology*, vol. 11, (2011), p. 50.
- [42] Fukuchi, S.; Yoshimune, K.; Wakayama, M.; Moriguchi, M.; and Nishikawa, K. Unique amino acid composition of proteins in halophilic bacteria. *Journal of molecular biology*, vol. 327, (2003), pp. 347–357.
- [43] Hutcheon, G.W.; Vasisht, N.; and Bolhuis, A. Characterisation of a highly stable alpha-amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, vol. 9, (2005), pp. 487–495.
- [44] Paul, S.; Bag, S.K.; Das, S.; Harvill, E.T.; and Dutta, C. Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biol*, vol. 9, (2008), p. R70.
- [45] Kastritis, P.L.; Papandreou, N.C.; and Hamodrakas, S.J. Haloadaptation: insights from comparative modeling studies of halophilic archaeal DHFRs. *Int J Biol Macromol*, vol. 41, (2007), pp. 447–453.
- [46] Tadeo, X.; López-Méndez, B.; Trigueros, T.; Laín, A.; Castaño, D.; and Millet, O. Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archea. *PLoS Biol*, vol. 7, (2009), p. e1000257.
- [47] Oren, A. and Mana, L. Amino acid composition of bulk protein and salt relationships of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. *Extremophiles*, vol. 6, (2002), pp. 217–223.
- [48] Richard, S.B.; Madern, D.; Garcin, E.; and Zaccai, G. Halophilic adaptation: novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry*, vol. 39, (2000), pp. 992–1000.
- [49] Becker, E.A.; Seitzer, P.M.; Tritt, A.; Larsen, D.; Krusor, M.; Yao, A.I.; Wu, D.; Madern, D.; Eisen, J.A.; Darling, A.E.; and Facciotti, M.T. Phylogenetically driven sequencing of extremely halophilic archaea reveals strategies for static and dynamic osmo-response. *PLoS Genet*, vol. 10, (2014), p. e1004784.

-
- [50] Winter, J.A.; Patoli, B.; and Bunting, K.A. DNA binding in high salt: analysing the salt dependence of replication protein A3 from the halophile *Haloferax volcanii*. *Archaea*, vol. 2012, (2012), p. 719092.
- [51] Bergqvist, S.; Williams, M.A.; O'Brien, R.; and Ladbury, J.E. Halophilic adaptation of protein-DNA interactions. *Biochem Soc Trans*, vol. 31, (2003), pp. 677–680.
- [52] Provvedi, R. and Dubnau, D. ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, vol. 31, (1999), pp. 271–280.
- [53] Inamine, G.S. and Dubnau, D. ComEA, a *Bacillus subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J Bacteriol*, vol. 177, (1995), pp. 3045–3051.
- [54] Doherty, A.J.; Serpell, L.C.; and Ponting, C.P. The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Res*, vol. 24, (1996), pp. 2488–2497.
- [55] Shao, X. and Grishin, N.V. Common fold in helix-hairpin-helix proteins. *Nucleic Acids Res*, vol. 28, (2000), pp. 2643–2650.
- [56] Seitz, P.; Pezeshgi Modarres, H.; Borgeaud, S.; Bulushev, R.D.; Steinbock, L.J.; Radenovic, A.; Dal Peraro, M.; and Blokesch, M. ComEA is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. *PLoS Genet*, vol. 10, (2014), p. e1004066.
- [57] Pavlov, A.R.; Belova, G.I.; Kozyavkin, S.A.; and Slesarev, A.I. Helix-hairpin-helix motifs confer salt resistance and processivity on chimeric DNA polymerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, (2002), pp. 13510–13515.
- [58] de Vega, M.; Lázaro, J.M.; Mencía, M.; Blanco, L.; and Salas, M. Improvement of ϕ 29 DNA polymerase amplification performance by fusion of DNA binding motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, (2010), pp. 16506–16511.
- [59] Pavlov, A.R.; Pavlova, N.V.; Kozyavkin, S.A.; and Slesarev, A.I. Cooperation between catalytic and DNA binding domains enhances thermostability and supports DNA synthesis at higher temperatures by thermostable DNA polymerases. *Biochemistry*, vol. 51, (2012), pp. 2032–2043.
- [60] Ramaswamy, G. and Wang, Y. Modified dnase compositions and methods of use thereof, 2012. US Patent App. 12/753,444.
- [61] Baker, N.A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M.J.; and McCammon, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98, (2001), pp. 10037–10041.
- [62] Norberg, J. Association of protein-DNA recognition complexes: electrostatic and nonelectrostatic effects. *Arch Biochem Biophys*, vol. 410, (2003), pp. 48–68.

- [63] Jayaram, B.; McConnell, K.; Dixit, S.B.; Das, A.; and Beveridge, D.L. Free-energy component analysis of 40 protein-DNA complexes: a consensus view on the thermodynamics of binding at the molecular level. *J Comput Chem*, vol. 23, (2002), pp. 1–14.
- [64] Feig, M.; Onufriev, A.; Lee, M.S.; Im, W.; Case, D.A.; and Brooks, 3rd, C.L. Performance comparison of generalized born and Poisson methods in the calculation of electrostatic solvation energies for protein structures. *J Comput Chem*, vol. 25, (2004), pp. 265–284.
- [65] Vuzman, D.; Polonsky, M.; and Levy, Y. Facilitated DNA search by multidomain transcription factors: cross talk via a flexible linker. *Biophys J*, vol. 99, (2010), pp. 1202–1211.
- [66] Misra, V.K. and Honig, B. On the magnitude of the electrostatic contribution to ligand-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 92, (1995), pp. 4691–4695.
- [67] Misra, V.K.; Hecht, J.L.; Yang, A.S.; and Honig, B. Electrostatic contributions to the binding free energy of the lambdacl repressor to DNA. *Biophys J*, vol. 75, (1998), pp. 2262–2273.
- [68] Sun, J.; Viadiu, H.; Aggarwal, A.K.; and Weinstein, H. Energetic and structural considerations for the mechanism of protein sliding along DNA in the nonspecific BamHI-DNA complex. *Biophys J*, vol. 84, (2003), pp. 3317–3325.
- [69] Furini, S.; Barbini, P.; and Domene, C. DNA-recognition process described by MD simulations of the lactose repressor protein on a specific and a non-specific DNA sequence. *Nucleic Acids Res*, vol. 41, (2013), pp. 3963–3972.
- [70] Furini, S. and Domene, C. DNA recognition process of the lactose repressor protein studied via metadynamics and umbrella sampling simulations. *J Phys Chem B*, vol. 118, (2014), pp. 13059–13065.
- [71] Record, Jr, M.; Lohman, M.L.; and De Haseth, P. Ion effects on ligand-nucleic acid interactions. *J Mol Biol*, vol. 107, (1976), pp. 145–158.
- [72] Bredenbergh, J.H.; Russo, C.; and Fenley, M.O. Salt-mediated electrostatics in the association of TATA binding proteins to DNA: a combined molecular mechanics/Poisson-Boltzmann study. *Biophys J*, vol. 94, (2008), pp. 4634–4645.
- [73] García-García, C. and Draper, D.E. Electrostatic interactions in a peptide-RNA complex. *J Mol Biol*, vol. 331, (2003), pp. 75–88.
- [74] Privalov, P.L.; Dragan, A.I.; and Crane-Robinson, C. Interpreting protein/DNA interactions: distinguishing specific from non-specific and electrostatic from non-electrostatic components. *Nucleic Acids Res*, vol. 39, (2011), pp. 2483–2491.

- [75] Russo, C. *Salt-dependence of protein-DNA binding: Insights into protein electrostatics and redesign*. THE FLORIDA STATE UNIVERSITY, 2010.
- [76] Hunter, S.; Jones, P.; Mitchell, A.; Apweiler, R.; Attwood, T.K.; Bateman, A.; Bernard, T.; Binns, D.; Bork, P.; Burge, S.; de Castro, E.; Coggill, P.; Corbett, M.; Das, U.; Daugherty, L.; Duquenne, L.; Finn, R.D.; Fraser, M.; Gough, J.; Haft, D.; Hulo, N.; Kahn, D.; Kelly, E.; Letunic, I.; Lonsdale, D.; Lopez, R.; Madera, M.; Maslen, J.; McAnulla, C.; McDowall, J.; McMenamin, C.; Mi, H.; Mutowo-Muellenet, P.; Mulder, N.; Natale, D.; Orengo, C.; Pesseat, S.; Punta, M.; Quinn, A.F.; Rivoire, C.; Sangrador-Vegas, A.; Selengut, J.D.; Sigrist, C.J.A.; Scheremetjew, M.; Tate, J.; Thimmajanan, M.; Thomas, P.D.; Wu, C.H.; Yeats, C.; and Yong, S.Y. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res*, vol. 40, (2012), pp. D306–D312.
- [77] , U.C. Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*, vol. 42, (2014), pp. D191–D198.
- [78] Jones, P.; Binns, D.; Chang, H.Y.; Fraser, M.; Li, W.; McAnulla, C.; McWilliam, H.; Maslen, J.; Mitchell, A.; Nuka, G.; Pesseat, S.; Quinn, A.F.; Sangrador-Vegas, A.; Scheremetjew, M.; Yong, S.Y.; Lopez, R.; and Hunter, S. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, vol. 30, (2014), pp. 1236–1240.
- [79] Bhardwaj, G.; Ko, K.D.; Hong, Y.; Zhang, Z.; Ho, N.L.; Chintapalli, S.V.; Kline, L.A.; Gotlin, M.; Hartranft, D.N.; Patterson, M.E.; Dave, F.; Smith, E.J.; Holmes, E.C.; Patterson, R.L.; and van Rossum, D.B. PHYRN: a robust method for phylogenetic analysis of highly divergent sequences. *PLoS One*, vol. 7, (2012), p. e34261.
- [80] Felsenstein, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, vol. 5, (1989), pp. 164–166.
- [81] Huerta-Cepas, J.; Dopazo, J.; and Gabaldón, T. ETE: a python Environment for Tree Exploration. *BMC Bioinformatics*, vol. 11, (2010), p. 24.
- [82] Petersen, T.N.; Brunak, S.; von Heijne, G.; and Nielsen, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, vol. 8, (2011), pp. 785–786.
- [83] Bagos, P.G.; Tsirigos, K.D.; Plessas, S.K.; Liakopoulos, T.D.; and Hamodrakas, S.J. Prediction of signal peptides in archaea. *Protein Eng Des Sel*, vol. 22, (2009), pp. 27–35.
- [84] Reynolds, S.M.; Käll, L.; Riffle, M.E.; Bilmes, J.A.; and Noble, W.S. Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic bayesian networks. *PLoS Comput Biol*, vol. 4, (2008), p. e1000213.
- [85] Remmert, M.; Biegert, A.; Hauser, A.; and Söding, J. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature methods*, vol. 9, (2012), pp. 173–175.

- [86] Roy, A.; Kucukural, A.; and Zhang, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols*, vol. 5, (2010), pp. 725–738.
- [87] Rodrigues, J.P.; Levitt, M.; and Chopra, G. KoBaMIN: a knowledge-based minimization web server for protein structure refinement. *Nucleic acids research*, p. gks376.
- [88] DeLano, W.L. The PyMOL molecular graphics system.
- [89] Dolinsky, T.J.; Nielsen, J.E.; McCammon, J.A.; and Baker, N.A. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson–Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic acids research*, vol. 32, (2004), pp. W665–W667.
- [90] Case, D.; Babin, V.; Berryman, J.; Betz, R.; Cai, Q.; Cerutti, D.; Cheatham III, T.; Darden, T.; Duke, R.; Gohlke, H.; et al. Amber 14.
- [91] Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; and Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, vol. 25, (1997), pp. 3389–3402.
- [92] Eddy, S.R. Accelerated profile HMM searches. *PLoS computational biology*, vol. 7, (2011), p. e1002195.
- [93] Katoh, K. and Standley, D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, vol. 30, (2013), pp. 772–780.
- [94] Katoh, K. and Toh, H. Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in bioinformatics*, vol. 9, (2008), pp. 286–298.
- [95] Celniker, G.; Nimrod, G.; Ashkenazy, H.; Glaser, F.; Martz, E.; Mayrose, I.; Pupko, T.; and Ben-Tal, N. ConSurf: using evolutionary data to raise testable hypotheses about protein function. *Israel Journal of Chemistry*, vol. 53, (2013), pp. 199–206.
- [96] Holm, L. and Rosenström, P. Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic acids research*, vol. 38, (2010), pp. W545–W549.
- [97] Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.; Clamp, M.; and Barton, G.J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, vol. 25, (2009), pp. 1189–1191.
- [98] Marchler-Bauer, A.; Derbyshire, M.K.; Gonzales, N.R.; Lu, S.; Chitsaz, F.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; He, J.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Lanczycki, C.J.; Lu, F.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; Thanki, N.; Wang, Z.; Yamashita, R.A.; Zhang, D.; Zheng, C.; and Bryant, S.H. CDD: NCBI’s conserved domain database. *Nucleic Acids Res.*

-
- [99] hmmscan :: search sequence(s) against a profile database. HMMER 3.1b1 (27 May 2013) ; <http://hmmer.org/>, 2013.
- [100] Finn, R.D.; Clements, J.; and Eddy, S.R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res*, vol. 39, (2011), pp. W29–W37.
- [101] Fu, L.; Niu, B.; Zhu, Z.; Wu, S.; and Li, W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, vol. 28, (2012), pp. 3150–3152.
- [102] Li, W. and Godzik, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, vol. 22, (2006), pp. 1658–1659.
- [103] Pei, J. and Grishin, N.V. PROMALS3D: multiple protein sequence alignment enhanced with evolutionary and three-dimensional structural information. *Methods Mol Biol*, vol. 1079, (2014), pp. 263–271.
- [104] Pei, J.; Kim, B.H.; and Grishin, N.V. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res*, vol. 36, (2008), pp. 2295–2300.
- [105] Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, vol. 30, (2014), pp. 1312–1313.
- [106] Shatsky, M.; Nussinov, R.; and Wolfson, H.J. A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins*, vol. 56, (2004), pp. 143–156.
- [107] Wing, R.A.; Bailey, S.; and Steitz, T.A. Insights into the replisome from the structure of a ternary complex of the DNA polymerase III alpha-subunit. *J Mol Biol*, vol. 382, (2008), pp. 859–869.
- [108] van Dijk, M. and Bonvin, A.M.J.J. 3D-DART: a DNA structure modelling server. *Nucleic Acids Res*, vol. 37, (2009), pp. W235–W239.
- [109] de Vries, S.J.; van Dijk, M.; and Bonvin, A.M.J.J. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat Protoc*, vol. 5, (2010), pp. 883–897.
- [110] Bercovich, A.; Vazquez, S.C.; Yankilevich, P.; Coria, S.H.; Foti, M.; Hernández, E.; Vidal, A.; Ruberto, L.; Melo, C.; Marensi, S.; et al. *Bizionia argentinensis* sp. nov., isolated from surface marine water in Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 58, (2008), pp. 2363–2367.
- [111] Schlesner, H.; Rensmann, C.; Tindall, B.J.; Gade, D.; Rabus, R.; Pfeiffer, S.; and Hirsch, P. Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA–DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of

- the genus *Pirellula*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, (2004), pp. 1567–1580.
- [112] Finegold, S.M.; Vaisanen, M.L.; Molitoris, D.R.; Tomzynski, T.J.; Song, Y.; Liu, C.; Collins, M.D.; and Lawson, P.A. *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. *Syst Appl Microbiol*, vol. 26, (2003), pp. 177–181.
- [113] Stackebrandt, E.; Päuker, O.; Steiner, U.; Schumann, P.; Sträubler, B.; Heihei, S.; and Lang, E. Taxonomic characterization of members of the genus *Coralloccoccus*: molecular divergence versus phenotypic coherency. *Syst Appl Microbiol*, vol. 30, (2007), pp. 109–118.
- [114] De Groot, A.; Chapon, V.; Servant, P.; Christen, R.; Fischer-Le Saux, M.; Sommer, S.; and Heulin, T. *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 55, (2005), pp. 2441–2446.
- [115] Ferreira, A.C.; Nobre, M.F.; Rainey, F.A.; Silva, M.T.; Wait, R.; Burghardt, J.; Chung, A.P.; and Da Costa, M.S. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. *International journal of systematic bacteriology*, vol. 47, (1997), pp. 939–947.
- [116] Pukall, R.; Zeytun, A.; Lucas, S.; Lapidus, A.; Hammon, N.; Deshpande, S.; Nolan, M.; Cheng, J.F.; Pitluck, S.; Liolios, K.; et al. Complete genome sequence of *Deinococcus maricopensis* type strain (LB-34T). *Standards in genomic sciences*, vol. 4, (2011), p. 163.
- [117] Copeland, A.; Zeytun, A.; Yassawong, M.; Nolan, M.; Lucas, S.; Hammon, N.; Deshpande, S.; Cheng, J.F.; Han, C.; Tapia, R.; et al. Complete genome sequence of the orange-red pigmented, radioresistant *Deinococcus proteolyticus* type strain (MRPT). *Standards in genomic sciences*, vol. 6, (2012), p. 240.
- [118] Thompson, B. and Murray, R. Isolation and characterization of the plasma membrane and the outer membrane of *Deinococcus radiodurans* strain Sark. *Canadian journal of microbiology*, vol. 27, (1981), pp. 729–734.
- [119] Filippini, M.; Kaech, A.; Ziegler, U.; and Bagheri, H.C. *Fibrisoma limi* gen. nov., sp. nov., a filamentous bacterium isolated from tidal flats. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 61, (2011), pp. 1418–1424.
- [120] Touchon, M.; Barbier, P.; Bernardet, J.F.; Loux, V.; Vacherie, B.; Barbe, V.; Rocha, E.P.; and Duchaud, E. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium branchiophilum*. *Applied and environmental microbiology*, vol. 77, (2011), pp. 7656–7662.

- [121] Van Trappen, S.; Vandecandelaere, I.; Mergaert, J.; and Swings, J. Flavobacterium degerlachei sp. nov., Flavobacterium frigoris sp. nov. and Flavobacterium micromati sp. nov., novel psychrophilic bacteria isolated from microbial mats in Antarctic lakes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, (2004), pp. 85–92.
- [122] Saha, P. and Chakrabarti, T. Flavobacterium indicum sp. nov., isolated from warm spring water in Assam, India. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 56, (2006), pp. 2617–2621.
- [123] McBride, M. and Kempf, M. Development of techniques for the genetic manipulation of the gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. *Journal of bacteriology*, vol. 178, (1996), pp. 583–590.
- [124] Kolton, M.; Sela, N.; Elad, Y.; and Cytryn, E. Comparative Genomic Analysis Indicates that Niche Adaptation of Terrestrial Flavobacteria Is Strongly Linked to Plant Glycan Metabolism. *PloS one*, vol. 8, (2013), p. e76704.
- [125] Suzuki, M.; Nakagawa, Y.; Harayama, S.; and Yamamoto, S. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 51, (2001), pp. 1639–1652.
- [126] Mann, A.J.; Hahnke, R.L.; Huang, S.; Werner, J.; Xing, P.; Barbeyron, T.; Huettel, B.; Stüber, K.; Reinhardt, R.; Harder, J.; et al. The Genome of the Alga-Associated Marine Flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T Reveals a Broad Potential for Degradation of Algal Polysaccharides. *Applied and environmental microbiology*, vol. 79, (2013), pp. 6813–6822.
- [127] Bjornson, H. and Hill, E. Bacteroidaceae in thromboembolic disease: effects of cell wall components on blood coagulation in vivo and in vitro. *Infection and immunity*, vol. 8, (1973), pp. 911–918.
- [128] Bumgarner, L.R. and Finkelstein, R.A. Pathogenesis and immunology of experimental gonococcal infection: virulence of colony types of *Neisseria gonorrhoeae* for chicken embryos. *Infection and immunity*, vol. 8, (1973), pp. 919–924.
- [129] Triches, T.C.; de Figueiredo, L.C.; Feres, M.; de Freitas, S.F.T.; Zimmermann, G.S.; and Cordeiro, M.M.R. Microbial profile of root canals of primary teeth with pulp necrosis and periradicular lesion. *J Dent Child (Chic)*, vol. 81, (2014), pp. 14–19.
- [130] Huggan, P.J. and Murdoch, D.R. Fusobacterial infections: clinical spectrum and incidence of invasive disease. *J Infect*, vol. 57, (2008), pp. 283–289.
- [131] Van Trappen, S.; Vandecandelaere, I.; Mergaert, J.; and Swings, J. *Gillisia limnaea* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Flavobacteriaceae

- isolated from a microbial mat in Lake Fryxell, Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, (2004), pp. 445–448.
- [132] Riedel, T.; Held, B.; Nolan, M.; Lucas, S.; Lapidus, A.; Tice, H.; Del Rio, T.G.; Cheng, J.F.; Han, C.; Tapia, R.; Goodwin, L.A.; Pitluck, S.; Liolios, K.; Mavromatis, K.; Pagani, I.; Ivanova, N.; Mikhailova, N.; Pati, A.; Chen, A.; Palaniappan, K.; Land, M.; Rohde, M.; Tindall, B.J.; Detter, J.C.; Göker, M.; Bristow, J.; Eisen, J.A.; Markowitz, V.; Hugenholtz, P.; Kyrpides, N.C.; Klenk, H.P.; and Woyke, T. Genome sequence of the Antarctic rhodopsins-containing flavobacterium *Gillisia limnaea* type strain (R-8282(T)). *Stand Genomic Sci*, vol. 7, (2012), pp. 107–119.
- [133] Koechler, S.; Plewniak, F.; Barbe, V.; Battaglia-Brunet, F.; Jost, B.; Joulian, C.; Philipps, M.; Vicaire, S.; Vincent, S.; Ye, T.; et al. Genome sequence of *Halomonas* sp. strain A3H3, isolated from arsenic-rich marine sediments. *Genome announcements*, vol. 1, (2013), pp. e00819–13.
- [134] Lin, Y.; Fan, H.; Hao, X.; Johnstone, L.; Hu, Y.; Wei, G.; Alwathnani, H.A.; Wang, G.; and Rensing, C. Draft genome sequence of *Halomonas* sp. strain HAL1, a moderately halophilic arsenite-oxidizing bacterium isolated from gold-mine soil. *Journal of bacteriology*, vol. 194, (2012), pp. 199–200.
- [135] Overholt, W.A.; Green, S.J.; Marks, K.P.; Venkatraman, R.; Prakash, O.; and Kostka, J.E. Draft genome sequences for oil-degrading bacterial strains from beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Genome announcements*, vol. 1, (2013), pp. e01015–13.
- [136] Cai, L.; Tan, D.; Aibaidula, G.; Dong, X.R.; Chen, J.C.; Tian, W.D.; and Chen, G.Q. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. *Microb Cell Fact*, vol. 10, (2011), p. 88.
- [137] Tan, D.; Xue, Y.S.; Aibaidula, G.; and Chen, G.Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol*, vol. 102, (2011), pp. 8130–8136.
- [138] Sikorski, J.; Tindall, B.J.; Lowry, S.; Lucas, S.; Nolan, M.; Copeland, A.; Del Rio, T.G.; Tice, H.; Cheng, J.F.; Han, C.; et al. Complete genome sequence of *Meiothermus silvanus* type strain (VI-R2T). *Standards in genomic sciences*, vol. 3, (2010), p. 37.
- [139] Sohn, J.H.; Lee, J.H.; Yi, H.; Chun, J.; Bae, K.S.; Ahn, T.Y.; and Kim, S.J. *Kordia algicida* gen. nov., sp. nov., an algicidal bacterium isolated from red tide. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, (2004), pp. 675–680.
- [140] Ren, S.X.; Fu, G.; Jiang, X.G.; Zeng, R.; Miao, Y.G.; Xu, H.; Zhang, Y.X.; Xiong, H.; Lu, G.; Lu, L.F.; et al. Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, vol. 422, (2003), pp. 888–893.

- [141] Hamilton, R.D. and Zahler, S.A. A study of *Leptotrichia buccalis*. *Journal of bacteriology*, vol. 73, (1957), p. 386.
- [142] Eribe, E.R.; Paster, B.J.; Caugant, D.A.; Dewhirst, F.E.; Stromberg, V.K.; Lacy, G.H.; and Olsen, I. Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov. and *Leptotrichia wadei* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, (2004), pp. 583–592.
- [143] Franzmann, P.; Springer, N.; Ludwig, W.; Conway de Macario, E.; and Rohde, M. A Methanogenic Archaeon from Ace Lake, Antarctica: *Methanococcoides burtonii* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, vol. 15, (1992), pp. 573–581.
- [144] Wilharm, T.; Zhilina, T.; and Hummel, P. DNA-DNA Hybridization of Methylophilic Halophilic Methanogenic Bacteria and Transfer of *Methanococcus halophilus* sp. to the Genus *Methanohalophilus* as *Methanohalophilus halophilus* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, vol. 41, (1991), pp. 558–562.
- [145] Wildgruber, G.; Thomm, M.; König, H.; Ober, K.; Richiuto, T.; and Stetter, K.O. *Methanoplanus limicola*, a plate-shaped methanogen representing a novel family, the Methanoplanaceae. *Archives of Microbiology*, vol. 132, (1982), pp. 31–36.
- [146] Ollivier, B.; Cayol, J.L.; Patel, B.; Magot, M.; Fardeau, M.L.; and Garcia, J.L. *Methanoplanus petrolearius* sp. nov., a novel methanogenic bacterium from an oil-producing well. *FEMS microbiology letters*, vol. 147, (1997), pp. 51–56.
- [147] Maeder, D.L.; Anderson, I.; Brettin, T.S.; Bruce, D.C.; Gilna, P.; Han, C.S.; Lapidus, A.; Metcalf, W.W.; Saunders, E.; Tapia, R.; et al. The *Methanosarcina barkeri* genome: comparative analysis with *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina mazei* reveals extensive rearrangement within methanosarcinal genomes. *Journal of bacteriology*, vol. 188, (2006), pp. 7922–7931.
- [148] Yoon, J.; Maneerat, S.; Kawai, F.; and Yokota, A. *Myroides pelagicus* sp. nov., isolated from seawater in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 56, (2006), pp. 1917–1920.
- [149] Lang, E. and Stackebrandt, E. Emended descriptions of the genera *Myxococcus* and *Corallocooccus*, typification of the species *Myxococcus stipitatus* and *Myxococcus macrosporus* and a proposal that they be represented by neotype strains. Request for an opinion. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 59, (2009), pp. 2122–2128.
- [150] Bruns, A.; Rohde, M.; and Berthe-Corti, L. *Muricauda ruestringensis* gen. nov., sp. nov., a facultatively anaerobic, appendaged bacterium from German North Sea intertidal sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 51, (2001), pp. 1997–2006.

- [151] Campbell, M.A.; Chain, P.S.G.; Dang, H.; El Sheikh, A.F.; Norton, J.M.; Ward, N.L.; Ward, B.B.; and Klotz, M.G. *Nitrosococcus watsonii* sp. nov., a new species of marine obligate ammonia-oxidizing bacteria that is not omnipresent in the world's oceans: calls to validate the names 'Nitrosococcus halophilus' and 'Nitrosomonas mobilis'. *FEMS Microbiol Ecol*, vol. 76, (2011), pp. 39–48.
- [152] Koops, H.P.; Böttcher, B.; Möller, U.; Pommerening-Röser, A.; and Stehr, G. Description of a new species of *Nitrosococcus*. *Archives of Microbiology*, vol. 154, (1990), pp. 244–248. ISSN 0302-8933.
- [153] Kwon, S.K.; Kim, B.K.; Song, J.Y.; Kwak, M.J.; Lee, C.H.; Yoon, J.H.; Oh, T.K.; and Kim, J.F. Genomic makeup of the marine flavobacterium *Nonlabens* (Donghaeana) *dokdonensis* and identification of a novel class of rhodopsins. *Genome biology and evolution*, vol. 5, (2013), pp. 187–199.
- [154] Yoon, J.H.; Kang, S.J.; Lee, C.H.; and Oh, T.K. *Donghaeana dokdonensis* gen. nov., sp. nov., isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol*, vol. 56, (2006), pp. 187–191.
- [155] Han, C.; Spring, S.; Lapidus, A.; Del Rio, T.G.; Tice, H.; Copeland, A.; Cheng, J.F.; Lucas, S.; Chen, F.; Nolan, M.; et al. Complete genome sequence of *Pedobacter heparinus* type strain (HIM 762-3T). *Standards in genomic sciences*, vol. 1, (2009), p. 54.
- [156] Schlesner, H. *Planctomyces brasiliensis* sp. nov., a Halotolerant Bacterium from a Salt Pit. *Systematic and applied microbiology*, vol. 12, (1989), pp. 159–161.
- [157] Itah, A. and Essien, J. Growth profile and hydrocarbonoclastic potential of microorganisms isolated from tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, (2005), pp. 1317–1322.
- [158] Kets, E.P.; Galinski, E.A.; de Wit, M.; de Bont, J.A.; and Heipieper, H.J. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida* S12. *J Bacteriol*, vol. 178, (1996), pp. 6665–6670.
- [159] Hendrickson, E.L.; Guevera, P.; Peñaloza-Vázquez, A.; Shao, J.; Bender, C.; and Ausubel, F.M. Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is *rpoN* dependent. *Journal of bacteriology*, vol. 182, (2000), pp. 3498–3507.
- [160] Proença, D.N.; Espírito Santo, C.; Grass, G.; and Morais, P.V. Draft genome sequence of *Pseudomonas* sp. strain M47T1, carried by *Bursaphelenchus xylophilus* isolated from *Pinus pinaster*. *J Bacteriol*, vol. 194, (2012), pp. 4789–4790.
- [161] Bowman, J.P.; McCammon, S.A.; Lewis, T.; Skerratt, J.H.; Brown, J.L.; Nichols, D.S.; and McMeekin, T.A. *Psychroflexus torquis* gen. nov., sp. nov. a psychrophilic species from Antarctic sea ice, and reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson et al. 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. *Microbiology*, vol. 144, (1998), pp. 1601–1609.

- [162] Wegner, C.E.; Richter, M.; Richter-Heitmann, T.; Klindworth, A.; Frank, C.S.; Glöckner, F.O.; and Harder, J. Permanent draft genome of *Rhodospirillum rubrum* strain SM41. *Marine genomics*, vol. 13, (2014), pp. 17–18.
- [163] Martínez-Cánovas, M.J.; Quesada, E.; Martínez-Checa, F.; del Moral, A.; and Béjar, V. *Salipiger mucescens* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium isolated from hypersaline soil, belonging to the α -Proteobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 54, (2004), pp. 1735–1740.
- [164] Harmon-Smith, M.; Celia, L.; Chertkov, O.; Lapidus, A.; Copeland, A.; Del Rio, T.G.; Nolan, M.; Lucas, S.; Tice, H.; Cheng, J.F.; et al. Complete genome sequence of *Sebaldella termitidis* type strain (NCTC 11300T). *Standards in genomic sciences*, vol. 2, (2010), p. 220.
- [165] Shieh, W.Y.; Liu, T.Y.; Lin, S.Y.; Jean, W.D.; and Chen, J.S. *Simiduia agarivorans* gen. nov., sp. nov., a marine, agarolytic bacterium isolated from shallow coastal water from Keelung, Taiwan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 58, (2008), pp. 895–900.
- [166] Nolan, M.; Gronow, S.; Lapidus, A.; Ivanova, N.; Copeland, A.; Lucas, S.; Del Rio, T.G.; Chen, F.; Tice, H.; Pitluck, S.; et al. Complete genome sequence of *Streptobacillus moniliformis* type strain (9901T). *Standards in genomic sciences*, vol. 1, (2009), p. 300.
- [167] Muller, F.; Brissac, T.; Le Bris, N.; Felbeck, H.; and Gros, O. First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environmental microbiology*, vol. 12, (2010), pp. 2371–2383.
- [168] Teh, B.S.; Abdul Rahman, A.Y.; Saito, J.A.; Hou, S.; and Alam, M. Complete genome sequence of the thermophilic bacterium *Thermus* sp. strain CCB_US3_UF1. *Journal of bacteriology*, vol. 194, (2012), p. 1240.
- [169] Nunes, O.C.; Manaia, C.M.; Da Costa, M.S.; and Santos, H. Compatible Solutes in the Thermophilic Bacteria *Rhodothermus marinus* and "Thermus thermophilus". *Appl Environ Microbiol*, vol. 61, (1995), pp. 2351–2357.
- [170] Murugapiran, S.K.; Huntemann, M.; Wei, C.L.; Han, J.; Detter, J.C.; Han, C.; Erkkila, T.H.; Teshima, H.; Chen, A.; Kyrpides, N.; et al. *Thermus oshimai* JL-2 and *T. thermophilus* JL-18 genome analysis illuminates pathways for carbon, nitrogen, and sulfur cycling. *Standards in genomic sciences*, vol. 7, (2013), p. 449.
- [171] Muyzer, G.; Sorokin, D.Y.; Mavromatis, K.; Lapidus, A.; Foster, B.; Sun, H.; Ivanova, N.; Pati, A.; d'Haeseleer, P.; Woyke, T.; et al. Complete genome sequence of *Thioalkalivibrio* sp. K90mix. *Standards in genomic sciences*, vol. 5, (2011), p. 341.
- [172] Graber, J.R. and Breznak, J.A. Physiology and nutrition of *Treponema primitia*, an H₂/CO₂-acetogenic spirochete from termite hindguts. *Applied and environmental microbiology*, vol. 70, (2004), pp. 1307–1314.

- [173] Vu, A.T.; Nguyen, N.C.; and Leadbetter, J.R. Iron reduction in the metal-rich guts of wood-feeding termites. *Geobiology*, vol. 2, (2004), pp. 239–247.
- [174] Graber, J.R.; Leadbetter, J.R.; and Breznak, J.A. Description of *Treponema azotonutricium* sp. nov. and *Treponema primitia* sp. nov., the first spirochetes isolated from termite guts. *Appl Environ Microbiol*, vol. 70, (2004), pp. 1315–1320.
- [175] Moore Foundation, J.C.V.I. BioProject entry Accession: PRJNA54737, 2010.
- [176] Bruston, F.; Delbarre, E.; Ostlund, C.; Worman, H.J.; Buendia, B.; and Duband-Goulet, I. Loss of a DNA binding site within the tail of prelamins A contributes to altered heterochromatin anchorage by progerin. *FEBS Lett*, vol. 584, (2010), pp. 2999–3004.
- [177] Bendtsen, J.D.; Kiemer, L.; Fausbøll, A.; and Brunak, S. Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol*, vol. 5, (2005), p. 58.
- [178] Worrall, A.F. and Connolly, B.A. The chemical synthesis of a gene coding for bovine pancreatic DNase I and its cloning and expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, vol. 265, (1990), pp. 21889–21895.
- [179] Guérout, M.; Picot, D.; Abi-Ghanem, J.; Hartmann, B.; and Baaden, M. How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. *PLoS Comput Biol*, vol. 6, (2010), p. e1001000.
- [180] Morgunova, E.; Gray, F.C.; Macneill, S.A.; and Ladenstein, R. Structural insights into the adaptation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from *Haloferax volcanii* to a high-salt environment. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, vol. 65, (2009), pp. 1081–1088.
- [181] Chen, I. and Gotschlich, E.C. ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J Bacteriol*, vol. 183, (2001), pp. 3160–3168.
- [182] Ma, Y.; Pannicke, U.; Schwarz, K.; and Lieber, M.R. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, vol. 108, (2002), pp. 781–794.
- [183] Tiefenbach, T. and Junop, M. Pso2 (SNM1) is a DNA structure-specific endonuclease. *Nucleic Acids Res*, vol. 40, (2012), pp. 2131–2139.
- [184] Dominski, Z. Nucleases of the metallo-beta-lactamase family and their role in DNA and RNA metabolism. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, vol. 42, (2007), pp. 67–93.
- [185] Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1, 2010.
- [186] de Beer, T.A.P.; Berka, K.; Thornton, J.M.; and Laskowski, R.A. PDBsum additions. *Nucleic Acids Res*, vol. 42, (2014), pp. D292–D296.

-
- [187] Kooijman, E.E.; Tieleman, D.P.; Testerink, C.; Munnik, T.; Rijkers, D.T.S.; Burger, K.N.J.; and de Kruijff, B. An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins. *J Biol Chem*, vol. 282, (2007), pp. 11356–11364.
- [188] Sokalingam, S.; Raghunathan, G.; Soundrarajan, N.; and Lee, S.G. A study on the effect of surface lysine to arginine mutagenesis on protein stability and structure using green fluorescent protein. *PLoS One*, vol. 7, (2012), p. e40410.
- [189] Shiffman, M.L.; Maciewicz, R.A.; Hu, A.W.; Howard, J.C.; and Li, H.J. Protein dissociation from DNA in model systems and chromatin. *Nucleic Acids Res*, vol. 5, (1978), pp. 3409–3426.
- [190] Fenley, M.O.; Russo, C.; and Manning, G.S. Theoretical assessment of the oligolysine model for ionic interactions in protein-DNA complexes. *J Phys Chem B*, vol. 115, (2011), pp. 9864–9872.
- [191] Várnai, P. and Zakrzewska, K. DNA and its counterions: a molecular dynamics study. *Nucleic Acids Res*, vol. 32, (2004), pp. 4269–4280.
- [192] Datta, K. and LiCata, V.J. Salt dependence of DNA binding by *Thermus aquaticus* and *Escherichia coli* DNA polymerases. *J Biol Chem*, vol. 278, (2003), pp. 5694–5701.