

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Arūnas Šilanskas

**KONTROLIUOJAMO AKTYVUMO RESTRIKCIJOS
ENDONUKLEAZIŲ-TRIPLEKSĄ FORMUOJANČIŲ
OLIGONUKLEOTIDŲ KONJUGATAI**

Daktaro disertacijos santrauka
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2012

Disertacija rengta 2002-2010 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute.

Mokslinis konsultantas

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

Disertacija ginama Vilniaus universiteto Biochemijos mokslo krypties taryboje:

Pirmininkas:

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

Nariai:

Prof. habil. dr. **Albertas Malinauskas** (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

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

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

Dr. **Artūras Jakubauskas** (VUL Santariškių klinikų hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centras, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Oponentai:

Prof. dr. **Rimantas Daugelavičius** (Vytauto Didžiojo universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Dr. **Saulius Serva** (Thermo Fisher Scientific, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Biochemijos mokslo krypties posėdyje 2012 m. birželio 26 d. 11 val. Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto konferencijų salėje.

Adresas: Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2012 m. gegužės 23 d.

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

VILNIUS UNIVERSITY

Arūnas Šilanskas

**RESTRICTION ENDONUCLEASE-TRIPLEX FORMING
OLIGONUCLEOTIDE CONJUGATES WITH
CONTROLLABLE CATALYTIC ACTIVITY**

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

Vilnius, 2012

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University during 2002-2010.

Scientific supervisor:

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

Evaluation board of dissertation of Biochemistry trend

Chairman

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

Reviewers

Prof. habil. dr. **Albertas Malinauskas** (Center for physical sciences and technology, physical sciences, biochemistry - 04 P)

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

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

Dr. **Artūras Jakubauskas** (Santariškių klinikos, Center of Hematology, Oncology and Transfusion Medicine, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Opponents

Prof. dr. **Rimantas Daugelavičius** (Vytautas Magnus University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Dr. **Saulius Serva** (Thermo Fisher Scientific, physical sciences, biochemistry - 04 P)

The thesis defence will take place at the Institute of Biotechnology, Vilnius University (Graičiūno 8, LT-02241 Vilnius, Lithuania) on 26th of June, 2012, at 11 a.m.

The summary of doctoral dissertation was sent on 23th of May, 2012.

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

Turinys

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS	6
ĮVADAS	7
TYRIMŲ METODIKA	10
REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	16
1. Restrikcijos endonukleazė MunI – alternatyva REazės-TFO konjugato konstravimui	16
1.1. MunI subvienetų apsikeitimas	17
1.2. MunI dimerizacijos paviršiaus tyrimas	19
1.2.1. Cys123, esančių MunI dimerizacijos paviršiuje, prienamumas cheminiams junginiams	19
1.2.2. GdmCl įtakota MunI denatūracija	20
2. MunI aktyvumo reguliavimas	21
2.1. MunI subvienetų sujungimas	22
2.1.1. DNR hidrolizė su X-MunI	23
2.1.2. X-MunI sąveikos su DNR tyrimas	24
2.2. MunI dimerizacijos paviršiaus blokavimas	25
2.2.1. Blokuoto MunI aktyvacija	26
2.2.2. DNR hidrolizė su blokuotu ir aktyvuotu MunI	28
2.2.3. Plazmidinės DNR hidrolizė su blokuotu ir aktyvuotu MunI.....	28
2.2.4. Blokuoto MunI sąveikos su DNR tyrimas.....	30
2.2.5. MunI blokavimas: išvados ir praktinis pritaikymas	30
3. Kontroliuojamų restrikcijos endonukleazių konstravimas	31
3.1. Blokuotos REazės-TFO konjugato konstravimas	32
3.1.1. DNR hidrolizė su blokuoto MunI-TFO konjugatu	34
3.2. Nukreipiamos REazės su pablogintu dimerizacijos paviršiumi kūrimas	35
3.2.1. Bse634I-TFO konjugato konstravimas.....	35
3.2.2. Bse634I-TFO konjugato aktyvumas ir specifiškumas	37
IŠVADOS	41
MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS	42
FINANSINĖ PARAMA	42
CURRICULUM VITAE	43
PADĖKA	44
SUMMARY	45
LITERATŪROS SĄRAŠAS	47

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

bp	bazių pora
JSA	jaučio serumo albuminas
DNR	deoksiribonukleorūgštis
DTT	1,4-ditiotreitolis
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
GdmCl	guanidino chloridas
NBB	2-nitrobenzil bromidas
GMBS	N-[γ -maleimidobutiriloksi]sukcinimido esteris
kbp	kilobazių pora(s)
nt	nukleotidas(ai)
PAAG	poliakrilamidinis gelis
PAGE	poliakrilamidiniogelio elektroforezė
NDS	natrio dodecilsulfatas
REazė	restrikcijos endonukleazė
TALE	į transkripcijos aktyvatorius panašus efektorius
MES	2-(N-morfolino)-etansulfoninė rūgštis
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
Wt	laukinis tipas
TFO	tripleksą formuojantis oligonukleotidas
TFS	tripleksą formuojanti seka
AUC	analitinis ultracentrifugavimas
CD	cirkuliarinis dichroizmas
HR	homologinė rekombinacija
UV	ultravioletinė šviesa
a.r.	aminorūgštis
SS	superspiralizuota DNR forma
VT	viengrandininį trūkį turinti DNR forma
L	linijinė DNR forma

IVADAS

Žmogaus genomas turi apie 20.000-25.000 skirtingų baltymus koduojančių genų (Collins ir kiti, 2004). Mutacijos, atsiradusios atitinkamuose genuose, gali lemti pakitusių baltymų atsiradimą, kurie sukelia įvairias ligas (pvz., vėžį), sutrikusį embriono vystymąsi ar priešlaikinę mirtį. Tokių genetinių ligų gydymui gali būti naudojama genų terapija, kurios metu atstatoma pakitusio geno funkcija. Pagrindinis genų terapijos uždavinys yra ištaisyti pakitusią geno seką nesugadinant viso likusio genomo.

Plačiausiai vystoma genų terapijos strategija yra paremta homologine rekombinacija (HR), kurios metu DNR seka, naudojama geno taisymui, yra pateikiama *in trans*. Pagrindinis šio metodo taikymo trūkumas yra žemas rekombinacijos dažnis (10^{-6}) žinduolių ląstelėse. Tačiau yra žinoma, kad dvigrandininio trūkio įvedimas žymiai pagreitina HR (10^{-1}). *In vivo* eksperimentų atveju dvigrandininio trūkio įvedimas turi būti ypač tikslus, todėl šis metodas reikalauja naujų molekulinų įrankių, kurie būtų itin specifiški ir griežtai kontroliuojami. Programuojamų ir kontroliuojamų DNR endonukleazių (meganukleazių) sukūrimas labai padėtų šią technologiją plačiau pritaikyti genų taisymo darbuose.

Kuriant meganukleazes, reikalingas genų terapijai, šiuo metu yra naudojama keletas skirtingų strategijų:

- (i) introninės (homing) endonukleazės (Arnould ir kiti, 2006; Grizot ir kiti, 2010; Paques ir Duchateau, 2007)
- (ii) cinko pirštų nukleazės (Beumer ir kiti, 2006; Bibikova ir kiti, 2002; Kim ir kiti, 1996; Miller ir kiti, 2007)
- (iii) TALE nukleazės (Christian ir kiti, 2010; Li ir kiti, 2011)
- (iv) programuojamos restrikcijos endonukleazės (Eisenschmidt ir kiti, 2005).

Šiame darbe mūsų pastangos buvo nukreiptos į itin specifiskų ir griežtai kontroliuojamų meganukleazių kūrimą naudojant restrikcijos endonukleazių (REazių)-tripleksą formuojančių oligonukleotidų (TFO) konjugatus. TFO, esantis REazių-TFO konjugatuose, sudaro DNR tripleksą (Fox, 2000) taip nukreipdamas restrikcijos fermentą prie konkretaus taikinio, kuriame norima įvesti dvigrandininį trūkį. Pirmas restrikcijos fermento-TFO konjugatas buvo gautas panaudojant viengrandininį PvuII variantą (scPvuII) (Eisenschmidt ir kiti, 2005). Šiame darbe mes eksperimentiškai ištyrėme galimybę REazių-TFO konjugatų konstravimui pritaikyti kitus restrikcijos fermentus. Tyrimo objektais buvo pasirinkti restrikcijos fermentai MunI ir Bse634I, kurie mūsų laboratorijoje yra gerai struktūriškai ir biochemiškai ištyrinėti (Deibert ir kiti, 1999; Grazulis ir kiti, 2002; Sasnauskas ir kiti, 1999; Stakenas ir kiti, 1992; Zaremba ir kiti, 2005; Zaremba ir kiti, 2006). MunI yra ortodoksinis IIP tipo restrikcijos fermentas, kuris atpažįsta ir kerpa C/AATTG seką („/“ rodo kirpimo vietą) abiejose DNR grandinėse esant Mg^{2+} jonams (Deibert ir kiti, 1999; Stakenas ir kiti, 1992). Šis fermentas yra dimeras ir kiekvienas jo monomeras turi po vieną aktyvų centrą, kuriame pekerpama viena DNR grandinė. Tuo tarpu Bse634I yra IIF tipo restrikcijos fermentas, kuris atpažįsta ir kerpa R/CCGGY seką („/“ rodo kirpimo vietą), kur R=A arba G, Y=C arba T (Repin ir kiti, 1995). Bse634I yra tetrameras (Grazulis ir kiti, 2002), kurio optimaliam aktyvumui reikalingi du specifiniai DNR taikiniai (Zaremba ir kiti, 2005). Buvo

parodyta, kad R226A pakeitimas paverčia fermentą neaktyviu monomeru, kuris, esant aukštesnei baltymo koncentracijai, vis dar sugeba sudaryti funkciškai aktyvų dimerą ir surišti specifinę DNR (Zaremba ir kiti, 2006). Tokia nuo koncentracijos priklausoma monomero-dimero pusiausvyra suteikia galimybę sukurti kontroliuojamą REazės-TFO konjugatą, kuris gali būti panaudotas genų taisymui.

Pagrindiniai darbo tikslai ir uždaviniai:

- Ištirti galimybę kontroliuoti restrikcijos endonukleazės MunI katalizinį aktyvumą panaudojant vidinius ir išorinius „jungiklius“.
- Sukonstruoti kontroliuojamo katalizinio aktyvumo MunI-TFO ir Bse634I-TFO konjugatus, tinkančius genų terapijos eksperimentams.

Mokslinis naujumas

Mes pirmą kartą pademonstravome, kad chemiškai blokuoto MunI-TFO konjugato dėka galime ne tik nukreipti fermentą prie norimo taikinio, bet ir „įjungti“ jo aktyvumą reikiamu laiku. Šis atradimas atveria naujas galimybes genų terapijai tinkančių meganukleazių konstravime. Taip pat mes sukonstravome Bse634I-TFO konjugatus ir parodėme, kad du neaktyvūs monomerai prisijungę prie DNR molekulės gali susijungti į aktyvų dimerą. Toks katalitinis modulis galėtų būti puiki alternatyva cinko pirštų nukleazių kataliziniam domeniui (FokI-N). Kadangi Bse634I pasižymi specifiskumu konkrečiai DNR sekai, tokios meganukleazės šalutinis aktyvumas karpant nespecifines sekas turėtų būti sumažėjęs.

Praktinė reikšmė

Šiuo tyrimu mes parodėme dvi alternatyvias restrikcijos endonukleazių-TFO konjugatų aktyvumo reguliavimo strategijas. Pirmuoju atveju mes sėkmingai pritaikėme restrikcijos endonukleazės blokavimą fotocheminiu junginiu bei konjugavimą su TFO fotoreguliuojamo MunI-TFO konjugato gavimui. Blokuotas MunI-TFO konjugatas, palyginus su scPvuII-TFO konjugatu, aprašytu Eisenschmidt ir kolegų (Eisenschmidt ir kiti, 2005), pasižymi dviem svarbiais privalumais. Pirma, blokuoto REazės-TFO konjugato preinkubacija su specifine DNR gali būti vykdoma bet kuriame buferyje, kuris tinka DNR triplekso susidarymui ir DNR hidrolizei. Antra, ši strategija realizuota panaudojant įprastą homodimerinę restrikcijos endonukleazę MunI, todėl ji gali būti taikoma ir konstruojant kontroliuojamus kitų restrikcijos endonukleazių konjugatus genų terapijai. Tokia pati strategija galėtų būti sėkmingai pritaikyta ir epigenetikoje, norint reguliuoti su DNR sąveikaujančių fermentų aktyvumą.

Alternatyvi strategija remiasi restrikcijos endonukleazės Bse634I monomerinio mutanto (R226A) susilpnėjusia dimerizacija. Du nukleazės monomerai dimerizuojasi ant DNR ir kerpa ją tik tuomet, kai atsiduria vienas šalia kito susidarant DNR tripleksams. Šios strategijos panaudojimas užtikrina kryptingą DNR hidrolizę nevykdant atskiros preinkubacijos.

Ginamieji disertacijos teiginiai:

- Restrikcijos endonukleazės MunI katalizinis aktyvumas gali būti reguliuojamas su dimerizacijos paviršiuje įvestu „oks-red“ jungikliu.

- Restrikcijos endonukleazės MunI katalizinis aktyvumas gali būti reguliuojamas su dimerizacijos paviršiuje įvestu fotochemiškai aktyviu junginiu.
- Sukonstruotas blokuoto MunI-TFO konjugatas leidžia ne tik nukreipti fermentą prie norimo taikinio, bet ir „įjungti“ jo aktyvumą reikiamu laiku.
- Bse634I-TFO konjugatas gali būti nukreiptas prie reikiamo taikinio ir hidrolizuoti jį be atskiros preinkubacijos, kuomet reakcijos buferis tinka DNR triplekso susidarymui ir DNR hidrolizei.

TYRIMŲ METODIKA

Fermentai. T4 polinukleotidkinazė, DNR polimerazė, šarminė fosfatazė, T4 DNR ligazė ir visos darbe naudotos restrikcijos endonukleazės pagamintos UAB „Fermentas“.

Visi šie produktai naudoti atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas.

Kamienai. Naudota *E. coli* ER2267 ir *E. coli* ER2566.

DNR. λ dam⁻dcm⁻ DNR gauta iš UAB “Fermentas”, plazmidė pUCGK-4 gauta iš G. Krucko (UAB “Fermentas”), pRIZ'-scPvuII-H6G4C scPvuII raiškos plazmidė ir pECFP-PvuII DNR substratinė plazmidė gauta iš K. Eisenschmidt (Justus Liebig University, Gysenas, Vokietija), pBse634IR3.7 (Ap^r) Bse634I raiškos plazmidė gauta iš M. Zarembos (Vilniaus Universitetas, Biotechnologijos Institutas, Vilnius, Lietuva).

Oligonukleotidai. Šiame darbe naudoti nemodifikuoti deoksioligonukleotidai buvo susintetinti “Metabion“ (Martinsried, Vokietija). Oligonukleotidai turintys modifikuotus nukleotidus susintetinti Eurogentec (Liege, Belgija).

1 lentelė. Darbe naudoti modifikuoti ir nemodifikuoti oligonukleotidai *

Oligonukleotidai	Seka	Paskirtis
TFO	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₁₂ -CTCTCTCTCTTTTTT-3'	DNR tripleksą formuojantis oligonukleotidas sujungimui su MunI.
TFO1	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₁₂ -MPMPMPMPMPPPPPP-3'	DNR tripleksą formuojantis oligonukleotidas sujungimui su Bse634I.
TFO2	5'-NH ₂ -(CH ₂) ₁₂ -PMPPMPMPMPMPPPP-3'	DNR tripleksą formuojantis oligonukleotidas sujungimui su Bse634I.
24/24 oligodupleksas	5'-GTGATACT <u>CAATTG</u> GAATCCGTCA-3' 3'-CACTATGAG <u>GTTAAC</u> CTTAGGCAT-5'	24/24 bp specifinis oligodupleksas MunI subvienetų apsikeitimo tyrimui.
23/23 oligodupleksas	5'-CGATGTGCTGAAGTTTAGACCTG-3' 3'-GCTACACGACTTCAAATCTGGAC-5'	23/23 bp nespecifinis oligodupleksas MunI subvienetų apsikeitimo tyrimui.
22/19 oligodupleksas	5'-ACCCGCGG <u>CAATTG</u> GGCCCTTT-3' 3'-TGGGCGCC <u>GTTAAC</u> CCGGG-5'	22/19 bp specifinis oligodupleksas MunI-DNR sąveikai tirti.
22/22 oligodupleksas	5'-AATAGGTCCTATAGCGAATGG-3' 3'-TTATCCAGGATATCCGCTTACC-5'	22/22 bp nespecifinis oligodupleksas MunI-DNR sąveikai tirti.

* MunI taikinyš paryškintas ir pabrauktas. M yra citidino analogas 5-metil-2'-deoksicitidinas ir P yra timino analogas 5-[1-propynyl]-2'-deoksiuridinas.

DNR oligodupleksai (1 lentelė) buvo gaunami sulydant atitinkamus viengrandinius deoksioligonukleotidus. Gaminant radioaktyviais izotopais žymėtus substratus, prieš sulydymą reikiama DNR grandinė buvo žymima 5'-gale ³³P izotopu panaudojant T4 polinukleotidkinazę ir [γ ³³P]ATP („Hartmann Analytic“).

Buferiai. Elektroforetinis buferis 30 mM MES-His (pH 6.5 esant 25 °C), 0.01 mM EDTA. Susirišimo buferis 30 mM MES-His (pH 6.5 esant 25 °C), 0.02 mM EDTA, 0.2

mg/ml JSA 10 % glicerolio. Lygsvarinimo buferis I 10 mM K-fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM NaCl, 7 mM 2-merkptoetanolio, 1 mM EDTA. Lygsvarinimo buferis II 20 mM Na-fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 0.5 M NaCl, 1 mM 2-merkptoetanolio. Lygsvarinimo buferis III 10 mM Na-fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 0.1 M NaCl. Lygsvarinimo buferis IV 10mM Na-fosfato (pH 6.0 esant 25 °C), 0.1 M NaCl. Saugojimo buferis I 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT ir 50 % glicerolio. Saugojimo buferis II 10 mM K-fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50 % glicerolio. Subvienetu apsikeitimo buferis 10 mM Bis-Tris-propanas (pH 6.5 ar pH 8.3 esant 25 °C), 100 mM NaCl, 10 mM DTT. Gelfiltracijos buferis 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25 °C), 0.2 M KCl. Titravimo buferis 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25 °C), 200 mM KCl. Denatūracijos buferis 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25 °C), 200 mM KCl ir 1 mM DTT. Aktyvavimo buferis 100 mM Na-acetato (pH 5.8 esant 25 °C), 0.2 M KCl ir 20 mM DTT. Susiuvimo buferis 100 mM K-fosfato (pH 7.0 esant 25 °C), 100 mM KCl. Reakcijos buferis I 10 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25 °C), 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 0.1 mg/ml JSA. Reakcijos buferis II 10 mM Tris-HCl (pH 8.5 esant 25 °C), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, ir 0.1 mg/ml JSA. Reakcijos buferis III 80 mM Tris-fosfato (pH 7.1 esant 25 °C), 2 mM spermino, 2 mM MgCl₂ ir 10 mM DTT. Reakcijos buferis IV 80mM Tris-fosfato (pH 7.1 esant 25 °C), 4 mM Mg²⁺, 1mM DTT. Triplekso buferis I 80 mM Tris-fosfato (pH 6.1 esant 25 °C), 1.0 M NaCl ir 4 mM Mg²⁺, 1mM DTT. Triplekso buferis II 80 mM Tris-fosfato (pH 6.1 esant 37 °C), 2 mM spermino, 2 mM MgCl₂ ir 10 mM DTT. Stop tirpalas I 75 mM EDTA (pH 9.0 esant 25 °C), 0.01 % bromfenolio mëlis ir 50 % glicerolio. Stop tirpalas II 50 mM EDTA (pH 8.0 esant 25 °C), 0.1% NDS, 0.01% bromfenolio mëlis, 50% glicerolio.

Elektroforezë agaroziniuose geliuose esant nedematūruojančioms sąlygoms. Įvairių plazmidinių substratų formų, susidarančių karpant superspiralizuotus plazmidinius substratus restrikcijos endonukleazėmis, atskyrimui naudoti 0.8 ir 1 % agaroziniai geliai. Elektroforetinio buferio sudëtis: 100 mM natrio borato, 15 mM natrio acetato, 2 mM EDTA (pH 8.2 esant 25 °C) ir 0.5 µg/ml etidžio bromido. UV lempa apšviesti geliai buvo fotografuojami skaitmenine fotokamera, o gauti vaizdai analizuojami programa 1D Main ("Advanced American Biotechnology"). DNR fragmentai, reikalingi genų inžinerijos procedūroms, buvo frakcionuojami 1-1.5 % agaroziniuose geliuose elektroforezës buferyje be etidžio bromido (40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant 25 °C) ir 1 mM EDTA).

Baltymų elektroforezë poliakrilamidiniame gelyje esant dematūruojančioms sąlygoms. Elektroforezës buferio sudëtis: 25 mM Tris, 190 mM glicino (pH 8.3 esant 25 °C) ir 0.1 % natrio dodecilsulfato (NDS). Koncentruojančio ir frakcionuojančio gelių sudëtis: atitinkamai 4 % (125 mM Tris-HCl (pH 6.8 esant 25 °C) ir 0.1 % NDS) ir 12 % (375 mM Tris-HCl (pH 8.8 esant 25 °C) ir 0.1 % NDS) akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 37.5:1). Baltymų mëginiai buvo sumaišomi 1:1 su mëginio buferiu (100 mM Tris-HCl (pH 6.8 esant 25 °C), 4 % NDS, 200 mM DTT, 20 % glicerolio), gauti mišiniai prieš elektroforezë palaikomi 3 min. 95 °C vandens vonelėje. Pavyzdžiai buvo frakcionuojami 1-1.5 h esant kambario temperatūrai (30 V/cm). Geliai, nudažyti kumasi mëlui, buvo fotografuojami skaitmenine fotokamera

(„Biometra BioDocAnalyze“), o gauti vaizdai analizuojami programa 1D Main („Advanced American Biotechnology“).

Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant nedenatūruojančioms sąlygoms.

Elektroforetinio buferio sudėtis: 30 mM MES-His (pH 6.5 esant 25 °C), 0.02 mM EDTA. Darbe naudoti 6 % akrilamido / N,N'-metilenbisakrilamido (santykis 29:1) geliai. Radioaktyviais izotopais žymėti oligodupleksai buvo sumaišomi su įvairiais baltymo kiekiais susirišimo buferyje (30 mM MES-His (pH 6.5 esant 25 °C), 0.02 mM EDTA, 0.2 mg/ml JSA 10 % glicerolio), gauti mišiniai palaikomi kambario temperatūroje 10 min. ir frakcionuojami gelyje 2 valandas esant kambario temperatūrai ir ~6 V/cm elektrinio lauko stiprumui. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinami, o radioaktyvi DNR detektuojama fosforescencinių ekranų („FujiFilm“) ir Cyclone™ skenerio („Packard Instruments“) pagalba.

MunI ir Bse634I ekspresija ir gryninimas. Laukinio tipo (wt) MunI ir His₆-MunI, turinčio C-galinį His₆ inkarą, raiškai naudotas *E. coli* ER2267 kamienas, turintis metiltransferazės geną plazmidėje pMunIM 6.2 (Tc^r, Cm^r) (Siksnyš ir kiti, 1994) bei MunI genus plazmidėse pUHE25-2-MunIR (Ap^r) ir pUHE25-2-MunI-H6G4C (Ap^r). His₆-Bse634I, turinčio C-galinį His₆ inkarą, raiškai naudotas *E. coli* ER2267 kamienas, turintis metiltransferazės geną plazmidėje pHpaIIM (Cm^r) (Grazulis ir kiti, 2002) bei Bse634I geną plazmidėje pBse634IR-H6G4C (Ap^r). Ląstelės buvo auginamos LB terpėje (Sambrook, 1989). 6 histidinių inkarą turintys baltymai išgryninti baltymų mišinių frakcionuojant Ni²⁺ jonus chelatuojančioje HisTrap HP bei HiTrap Heparin HP kolonėlėse (GE Healthcare, Uppsala, Švedija). Wt MunI buvo išgrynintas skysčių chromatografijos būdu naudojant heparinsefarozę (GE Healthcare, Uppsala, Švedija), bluesefarozę bei fosfoceliuliozę (Whatman). Frakcijos turinčios tikslinį MunI baltymą buvo dializuotos prieš saugojimo buferį I: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT ir 50 % glicerolio. Frakcijos turinčios Bse634I baltymą buvo dializuotos prieš saugojimo buferį II: 10 mM K-fosfato (pH 7.4 esant 25 °C), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50 % glicerolio.

MunI subvienetų apsikeitimas. Lygūs kiekiai wt MunI ir His₆-MunI (iki 4 μM kaip dimero) buvo sumaišyti Subvienetų apsikeitimo buferyje. Taip pat tokie patys baltymų kiekiai buvo sumaišyti papildomai pridedant specifinio (turinčio MunI taikinių) 24/24 bp ar nespecifinio (neturinčio MunI taikinių) 23/23 bp oligoduplekso bei CaCl₂ iki 10mM. Po sumaišymo baltymų mišiniai buvo padalinti po 300 ar 500 μl į mėgintuvėlius ir inkubuoti 25°C ir 37°C. Po įvairių inkubacijos laikotarpių baltymų mišiniai buvo užnešti ant 1 ml HiTrap Heparin HP kolonėlės ir eliuuoti su Lygsvarinimo buferiu IV. Wt MunI bei MunI turintis vieną ar du His₆ inkarus nuo kolonėlės atsiskyrė atskiromis smailėmis. Subvienetų apsikeitimo greitis buvo matuojamas integruojant eliucijos kreivės smailes bei paskaičiuojant susidariusio heterodimero frakcijos dalį (2 paveikslas).

Gelfiltracija. Laukinio tipo ir chemiškai blokuoto („caged“) MunI gelfiltracijos eksperimentai buvo atlikti naudojant ÄKTA FPLC chromatografinę sistemą ir Superdex 200 HR kolonėlę (GE Healthcare, Uppsala, Švedija). Gelfiltracijos buferio sudėtis: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 esant 25 °C), 0.2 M KCl. Baltymų molekulinės masės buvo paskaičiuotos naudojantis kalibracine kreive, sudaryta nustačius žinomos molekulinės masės standartinių baltymų (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) eliucijos tūrius.

MunI cisteinų titravimas su DTNB. MunI preparatas buvo dializuotas prieš Titravimo buferį tam, kad pašalinti DTT. 20 μM MunI (kaip monomero) buvo sumaišyta su 200 μM 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoine rūgštimi) (DTNB) Titravimo buferyje nesant ir esant 1.5 M GdmCl. Susidaręs geltonos spalvos reakcijos produktas TNB^{2-} buvo matuojamas spektrofotometriškai prie 412 nm ilgio bangos, kuomet ekstinkcijos koeficientas yra $13600 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

MunI denatūravimo su GdmCl tyrimas. MunI denatūracijos eksperimentai buvo atlikti sumaišant baltymų tirpalus (galutinės baltymų koncentracijos atitinkamai 1 μM , 8 μM ir 5.4 μM fluorescencijos, CD ir analitinio ultracentrifugavimo (AUC) eksperimentuose) su įvairiais GdmCl kiekiais Denatūracijos buferyje. Pavyzdžiai buvo inkubuojami per naktį esant 25 °C temperatūrai, po to buvo pamatuoti jų fluorescencijos ir CD signalai bei AUC pagalba nustatytos molekulinės masės.

MunI subvienetų sujungimas. Norint MunI subvienetus sujungti per C123 aminorūgštis, preparatas buvo dializuotas prieš Lygsvarinimo buferį III tam, kad pašalinti DTT. Į baltymo tirpalą buvo pridėta vario fenantrolino (0.2 mM CuSO_4 ir 0.8 mM fenantrolino) tam, kad paspartinti disulfidinės jungties susidarymą. Taip pat buvo pridėta GdmCl iki 1 M tam, kad MunI subvienetai atsiskirtų ir C123 taptų prieinami. Po reakcijos vario fenantrolinas buvo neutralizuotas pridėjus 100 mM EDTA, o GdmCl buvo pašalintas dializuojant tirpalą prieš Lygsvarinimo buferį III. Per cisteinus sujungto MunI (X-MunI) gryninimas nuo nesujungto MunI buvo vykdomas panaudojant 1ml HiTrap Heparin kolonėlę. (GE Healthcare, Uppsala, Švedija). Leidžiant per kolonėlę NaCl tirpalo gradientą X-MunI atsikabina pirmiau nei wt MunI. Frakcijos su X-MunI buvo dializuotos prieš Saugojimo buferį I.

MunI dimerizacijos paviršiaus cheminis blokavimas. Norint pagaminti MunI monomerus (neaktyvų MunI variantą) dimerizacijos paviršiuje esanti C123 aminorūgštis buvo chemiškai blokuojama paveikus ją su fotocheminiu junginiu 2-nitrobenzilbromidu (NBB) Lygsvarinimo buferyje III. Tam, kad MunI subvienetai atsiskirtų ir C123 taptų prieinami buvo pridėta GdmCl iki 1 M. Reakcija buvo vykdoma per naktį esant 4 °C temperatūrai. Po reakcijos NBB perteklius buvo neutralizuotas pridedant DTT iki 1 mM ir pašalintas reakcijos mišinį dializuojant prieš Lygsvarinimo buferį III. Chemiškai blokuotas MunI (monomeras) nuo nesureagavusio MunI (dimerio) buvo atskirtas panaudojant gelfiltraciją su Superdex 200 HR kolonėle (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) Gelfiltracijos buferyje. Frakcijos su monomeriniu MunI buvo dializuotos prieš Saugojimo buferį I.

Chemiškai blokuoto MunI aktyvavimas. Chemiškai blokuoto MunI aktyvavimas buvo vykdomas švitinant baltymą 1 val. su UV šviesa (330 nm) Aktyvavimo buferyje esant 4 °C temperatūrai. UV šviesos šaltiniu buvo naudojamas spektrofluorimetras Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Stanmore, Jungtinė Karalystė). Po švitinimo aktyvuotas MunI (dimeras) buvo atskirtas nuo neaktyvuoto panaudojant gelfiltraciją (taip kaip aprašyta aukščiau).

Blokuoto MunI-TFO bei Bse634I-TFO konjugatų konstravimas ir gryninimas. His₆-MunI monomeras turi dvi Cys aminorūgštis: viena yra dimerizacijos paviršiuje, kita C-gale, reikalinga chemiškai prijungti tripleksą formuojantį oligonukleotidą (TFO) prie baltymo. Norint teisinga eilės tvarka modifikuoti šiuos cisteinus buvo atliktos trys procedūros. Pirmiausia C-galinai cisteinai buvo blokuoti sudarant disulfidinę jungtį tarp

jų. Tuo tikslu His₆-MunI buvo užneštas ant 1 ml HiTrap Heparin HP kolonėlės (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) ir su Lygsvarinimo buferiu III buvo nuplautas nuo DTT. Tuomet per kolonėlę buvo praleistas buferis su vario fenantrolinu, kuris paskatino disulfidinės jungties susidarymą tarp C-galinių cisteinų, tačiau cisteinai, esantys dimerizacijos paviršiuje, lieka neprieinami (16A paveikslas). Po reakcijos vario fenantrolinas buvo neutralizuotas su 100 mM EDTA ir baltymas buvo atkabintas nuo kolonėlės panaudojant NaCl gradientą. Kitame etape dimerizacijos paviršiuje esantys cisteinai buvo chemiškai blokuoti su NBB Lygsvarinimo buferyje III. Papildomai buvo pridėta GdmCl iki 1 M, kuris atskiria MunI subvienetus ir leidžia modifikuoti sąveikos paviršiuje esančius cisteinus (C123) (16B paveikslas). Po reakcijos mišinys buvo dializuotas prieš Lygsvarinimo buferį III, turintį 50 mM DTT, kuris neutralizuoja NBB perteklių bei suardo tarp C-galinių cisteinų esančią disulfidinę jungtį. Monomerinis blokuotas MunI buvo atskirtas nuo nesureagavusio MunI panaudojant 1 ml HiTrap Heparin HP kolonėlę (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) ir NaCl gradientą su Lygsvarinimo buferiu IV bei 0.2 mM tris(2-karboksietil)fosfino (TCEP). Paskutinėje stadijoje prie blokuoto (monomerinio) MunI C-galinio cisteino buvo prikabinamas TFO taip kaip aprašyta Eisenschmidt ir kiti (Eisenschmidt ir kiti, 2005) (16C paveikslas). Tokiu pačiu principu TFO1 ir TFO2 buvo prikabinti prie His₆-Bse634I C-galinio cisteino. Susidarę blokuoto MunI-TFO bei Bse634I-TFO konjugatai buvo atskirti nuo nesureagavusių baltymų panaudojant MonoQ 5/50 GL kolonėlę (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) su NaCl gradientu. Nesureagavę baltymai ant kolonėlės nekimba, o konjugatai bei TFO perteklius nuo sorbento atsikabina atskiromis smailėmis. Sukonstruotas ir išgrynintas blokuoto MunI-TFO konjugatas buvo dializuotas prieš Saugojimo buferį I, o Bse634I-TFO konjugatai dializuoti prieš Saugojimo buferį II.

Plazmidinės DNR hidrolizė su X-MunI. X-MunI DNR hidrolizės aktyvumas buvo tikrintas naudojant pUCGK-4 plazmidę (gauta iš G. Krucko), kuri turi vieną MunI taikinį. DNR hidrolizė buvo vykdyta 0.75 nM wt MunI ir X-MunI sumaišius su 1.5 nM plazmidinės DNR Reakcijos buferyje I esant 25 °C temperatūrai. Reakcijos stabdytos pridėjus Stop tirpalo I. Susidariusios įvairios plazmidinės DNR formos buvo atskiriamos elektroforezės agaroziniuose geliuose būdu ir detektuojamos kaip aprašyta aukščiau.

Plazmidinės DNR hidrolizė su chemiškai blokuotu ir aktyvuotu MunI. Wt MunI, chemiškai blokuoto bei aktyvuoto MunI DNR hidrolizės aktyvumas buvo tikrintas naudojant bakteriofago λ DNR. 400 nM (kaip dimero) kiekvieno baltymo buvo sumaišyta su 1 μg λ DNR Reakcijos buferyje I ir inkubuota 15 min. esant 37 °C temperatūrai. Detalus šių baltymų DNR hidrolizės aktyvumas buvo tikrintas naudojant pUCGK-4 plazmidę (gauta iš G. Krucko), kuri turi vieną MunI taikinį. 0.75 nM wt MunI ir 1.5 nM chemiškai blokuoto bei aktyvuoto MunI buvo sumaišyta su 1.5 nM plazmidinės DNR Reakcijos buferyje I esant 25 °C temperatūrai. Visi pavyzdžiai tam tikrais laiko intervalais buvo sumaišyti su Stop tirpalu II. Susidariusios įvairios DNR formos buvo atskiriamos elektroforezės agaroziniuose geliuose pagalba ir detektuojamos kaip aprašyta aukščiau.

REazių-TFO konjugatų nukreipimas prie tikslinio DNR taikinio ir DNR hidrolizės aktyvumo tyrimas. Blokuoto MunI-TFO konjugato DNR hidrolizės tyrimai buvo atlikti naudojant tikslinį taikinį turinčio (1880 bp DNR fragmentas, turintis vieną MunI taikinį, nuo kurio į abi puses per 9 bp nutolę TFS) ir įprastinį taikinį turinčio (3675 bp DNR fragmentas, turintis vieną MunI taikinį ir jokių TFS) DNR fragmentų mišinį. 100 nM

abiejų DNR fragmentų mišinys buvo sumaišytas su 400 nM blokuoto MunI-TFO konjugato Triplekso buferyje I ir per naktį inkubuotas esant 4 °C temperatūrai. Norint aktyvuoti konjugatą į baltymo-DNR mišinį buvo pridėta DTT iki 20 mM ir švitinta su UV šviesa (330 nm) 1 val. esant 4 °C temperatūrai taip kaip buvo aprašyta anksčiau. DNR hidrolizė buvo paleista 10 kartų skiedžiant mišinį su Reakcijos buferiu II ir inkubuojant prie 20 °C temperatūros. Bse634I-TFO konjugatų aktyvumas buvo tiriamas naudojant linearizuotą 5.5 kbp pECFP-Bse634I plazmidę, turinčią septynis Bse634I taikinius, vienas iš kurių (tikslinis taikynys) yra iš abiejų pusių apsuptas TFS1 ir TFS2 sekomis, nutolusiomis per 9bp. 50nM linearizuotos DNR buvo sumaišyta su Bse634I-TFO1 ir Bse634I-TFO2 konjugatų ekvimoliariniu mišiniu (iš viso 200 nM monomerų) Triplekso buferyje II esant 37 °C temperatūrai. Visi pavyzdžiai tam tikrais laiko intervalais buvo sumaišyti su Stop tirpalu II. Susidariusios įvairios DNR formos buvo atskiriamos elektroforezės agaroziniuose geliuose būdu ir detektuojamos kaip aprašyta aukščiau.

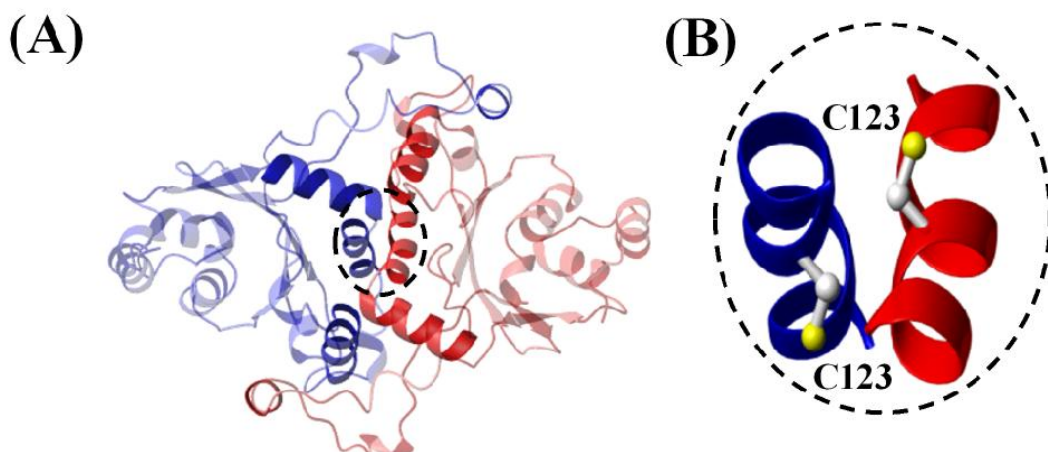
Baltymo ir DNR sąveikos tyrimas. Šiuose eksperimentuose buvo naudoti ³³P izotopu pažymėti specifinis (22/19) ir nespecifinis (22/22) bp dupleksai (Lentelė 1). Įvairūs wt MunI, X-MunI chemiškai blokuoto ir aktyvuoto MunI) kiekiai buvo inkubuojami su DNR dupleksais (2 nM) Susirišimo buferyje 10 min. esant kambario temperatūrai. Laisva DNR ir baltymo-DNR kompleksai buvo frakcionuojami 6% poliakrilamidiniame gelyje esant nedenaatūruojančioms sąlygoms, kaip aprašyta aukščiau. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinami, o radioaktyvi DNR detektuojama fosforescencinių ekranų („FujiFilm“) ir CycloneTM skenerio („Packard Instruments“) pagalba.

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1. Restrikcijos endonukleazė MunI – alternatyva REazės-TFO konjugato konstravimui

Restrikcijos endonukleazės atrodo idealiai tinkančios dvigrandininio trūkio įvedimui šalia pakitusio geno segmento tam, kad pagreitintų HR dažnį, tačiau jų pritaikymą ap sunkina per trumpa DNR atpažinimo seka. Pradiniame tyrime Eisenschmidt ir kolegų parodė, kad viengrandinės homodimerinės REazės PvuII scPvuII-TFO konjugatas gali būti specifiskai nukreiptas prie reikiamo PvuII DNR taikinio. Šiame darbe autoriai panaudojo viengrandinį homodimerinės REazės variantą, nes monomeriniame baltyme užtenka vieno įvesto Cys, reikalingo TFO prijungimui. ScPvuII sujungimas su TFO išplėtė fermento DNR atpažinimo seką, kuri susideda iš PvuII taikinio ir tripleksą formuojančios sekos (TFS). Tačiau scPvuII turi trūkumą – ne kiekviena REazė gali būti sukonstruota kaip viengrandinė. Todėl buvo ieškoma PvuII alternatyvių restrikcijos fermentų.

Restrikcijos endonukleazė (REazė) MunI buvo rasta mikroorganizme *Mycoplasma unidentified* (Stakenas ir kiti, 1992). MunI yra dimeras, kurio kiekvienas subvienetas turi po aktyvų centrą (Deibert ir kiti, 1999). Jis atpažįsta heksanukleotidinę seką C/AATTG ir, esant Mg^{2+} jonams, kerpa abi jos grandines po pirmo nukleotido kaip parodyta su „/“ (Deibert ir kiti, 1999; Stakenas ir kiti, 1992). Taip pat yra žinoma šio fermento erdvinė struktūra, kuri buvo nustatyta rentgenostruktūrinės analizės būdu (1A paveikslas) (Deibert ir kiti, 1999). Visa tai MunI daro patraukliu objektu kuriant genų taisymo įrankius.



1 paveikslas. MunI dimerizacijos paviršius. (A) REazės MunI erdvinė struktūra. Abiejų monomerų spiralės pavaizduotos mėlynai ir raudonai. Baltymo dimerizacijoje dalyvaujančios spiralės pavaizduotos ryškesne spalva. (B) dalyje išdidintas regionas yra apibrėžtas. (B) MunI dimerizacijos paviršius su cisteiniais (C123), tinkančiais fotocheminiam blokavimui.

Tam, kad iširtume ar ortodoksinė dimerinė REazė gali būti panaudota genų taisymo įrankių konstravime mes panaudojome MunI kaip modelinę sistemą. Norėdami vieną TFO prijungti prie dimerinio restrikcijos fermento, turime žinoti ar jo subvienetai apsikeičia lėtai. Tuo tikslu pirmiausia buvo tiriamas MunI subvienetų apsikeitimo greitis.

1.1. MunI subvienetų apsikeitimas

Oligomerinių baltymų subvienetų apsikeitimo greičiui nustatyti yra naudojami įvairūs būdai, tokie kaip Fiorsterio rezonansinės energijos perdavimas (FRET) tarp subvienetų, pažymėtų fluorescencijos donoru ir akceptoriumi (Merickel ir kiti, 2002), realaus laiko nanoelektroskopinė masių spektrometrija (Sobott ir kiti, 2002), jonų mainų chromatografija (Schneider ir kiti, 2001) ar gelfiltracija, kuomet apsikeičia skirtingos molekulinės masės baltymų subvienetai (Park ir kiti, 2004).

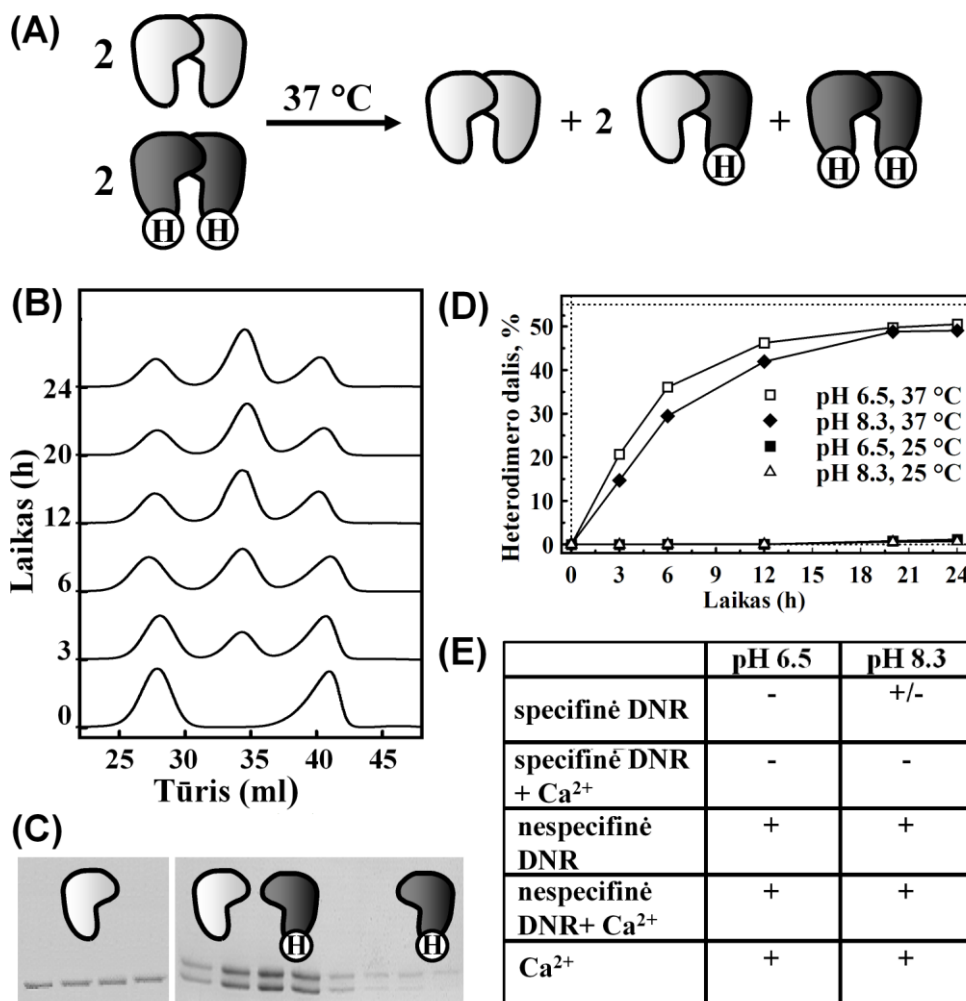
Tam, kad nustatytume MunI subvienetų apsikeitimo greitį bei rastume sąlygas dimerui stabilizuoti buvo panaudota afininė chromatografija. Lygūs kiekiai wt MunI ir His₆MunI, turinčio C-galinį His₆ inkarą (His₆MunI), sumaišyti Subvienetų apsikeitimo buferyje, kurio pH 6.5 ar 8.3 ir 24 val. inkubuoti 25 °C ir 37 °C. Wt MunI ir His₆MunI buvo atskirti panaudojant heparinsefarozės kolonėlę su buferiu, kurio pH 6.0 (2A paveikslas). Esant tokiam buferio pH His₆MunI daug stipriau sąveikauja su heparinsefarozės sorbentui nei wt MunI, nes greičiausiai dėl histidinių protonizacijos padidėja baltymo teigiamas krūvis. Per kolonėlę praleidus NaCl gradientą buvo gautos trys baltymų eliuacijos smailės (2B paveikslas). Gautų pavyzdžių NDS forezė patvirtino heterodimero susidarymą, nes vidurinėsios smailės frakcijos buvo sudarytos iš wt ir His₆ baltymų lygiomis dalimis (2C paveikslas).

Norint pamatuoti subvienetų apsikeitimo greitį wt MunI ir His₆MunI mišinys buvo inkubuotas įvairiems laikams. Po inkubacijos pavyzdžiai buvo užnešti ant 1 ml HiTrap Heparin HP kolonėlės (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) ir eliuuoti su NaCl gradientu tam, kad atskirtume skirtingas baltymų formas. Subvienetų apsikeitimo greitis buvo matuojamas integruojant skirtingais laikais gautus atitinkamų eliuacijos smailių profilius (2C paveikslas).

Temperatūros įtaka subvienetų apsikeitimui. Priešingai nei kitos ortodoksinės II tipo REazės EcoRV atveju, kurios subvienetai neapsikeičia 37°C temperatūroje (Stahl ir kiti, 1996), MunI pademonstravo aiškia subvienetų apsikeitimo priklausomybę nuo temperatūros. Tyrimas parodė, kad jau po 20 val. wt MunI ir His₆MunI inkubacijos 37 °C temperatūroje buvo gautas pilnas subvienetų apsikeitimas (2D paveikslas). MunI subvienetų apsikeitimas nelabai priklausė nuo buferio pH, tačiau labai sulėtėjo žeminant temperatūrą. Inkubavus baltymų mišinį 24 val. 25°C temperatūroje buvo gauta tik apie 1% heterodimero (2D paveikslas).

DNR įtaka subvienetų apsikeitimui. Norint nustatyti DNR įtaką MunI subvienetų apsikeitimo greičiui toks pat baltymų mišinys buvo sumaišytas su specifiniu (turinčiu MunI taikinį) 24/24 bp ar nespecifiniu (neturinčiu MunI taikinio) 23/23 bp oligodupleksu (2E paveikslas). Esant buferio pH 6.5 gautos eliuacijos kreivės rodė tik pradinius baltymus ir joks subvienetų apsikeitimas nepastebėtas, kuomet į tirpalą buvo įdėta specifinio oligoduplekso. Nespecifinio oligoduplekso pridėjimas tomis pačiomis sąlygomis subvienetų apsikeitimo nesustabdė ir heterodimero susidarymas buvo stebimas. Tačiau, esant buferio pH 8.3, specifinio oligoduplekso pridėjimas tik dalinai

pristabdė subvienetų apsikeitimą - buvo gauta apie 20% heterodimero. Baltymų-DNR sąveikos tyrimas parodė, kad REazė MunI rišasi su specifine DNR esant buferio pH 6.5, tuo tarpu, kai buferio pH 8.3, sąveika daug silpnesnė (Haq ir kiti, 2001; Lagunavicius ir kiti, 1997). Kuomet MunI suriša specifinę DNR esant pH 6.5, jo dimeras būna stabilizuotas ir subvienetais neapsikeičia. Esant pH 8.3 baltymo-DNR sąveika daug silpnesnė, todėl tik 1000 kartų didesnės MunI ir DNR koncentracijos kažkiek pristabdo subvienetų apsikeitimą.



2 paveikslas. MunI subvienetų apsikeitimas. (A) Subvienetų apsikeitimo schema. (B) Wt MunI ir His₆-MunI elucijos nuo 1 ml HiTrap Heparin kolonėlės (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) profiliai po subvienetų apsikeitimo 37 °C temperatūroje. (C) Eliucijos frakcijų po subvienetų apsikeitimo 37 °C temperatūroje tyrimas NDS-PAGE metodu. (D) Subvienetų apsikeitimo priklausomybė nuo temperatūros esant skirtingiems buferio pH. (E) Subvienetų apsikeitimo priklausomybė nuo DNR ir Ca²⁺ jonų esant skirtingiems buferio pH.: (+) – subvienetai apsikeičia, (-) – subvienetai neapsikeičia.

Ca²⁺ jonų įtaka subvienetų apsikeitimui. Yra žinoma, kad esant pH 8.3 Ca²⁺ jonai skatina MunI sąveiką su specifine DNR, tačiau neturi jokios įtakos kai pH 6.5 (Lagunavicius ir kiti, 1997). Todėl, MunI subvienetų apsikeitimas buvo tiriamas esant ir neesant specifinei ir nespecificinei DNR su ir be Ca²⁺ jonų (2E paveikslas). Buvo nustatyta, kad, esant specifinei DNR buferyje, kurio pH 8.3, Ca²⁺ jonai sustabdė MunI

subvienetų apsikeitimą, tačiau Ca^{2+} jonai neturėjo jokios įtakos esant nespecifinei DNR kai pH 6.5 ar 8.3.

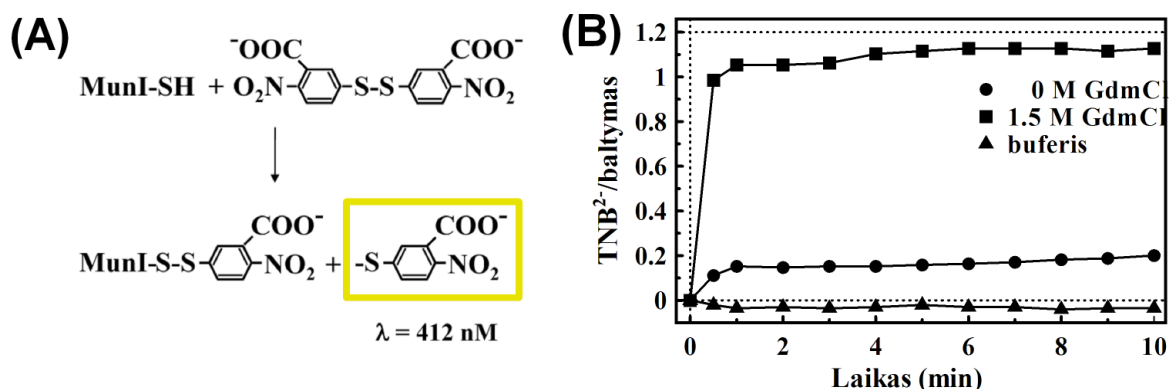
Apibendrinus gautus rezultatus galima padaryti išvadą, kad MunI apsikeičia subvienetais esant aukštesnei temperatūrai (37 °C), o žemesnė temperatūra (<25 °C) ar specifinės DNR pridėjimas gali stabilizuoja dimerą ir sustabdo subvienetų apsikeitimą.

1.2. MunI dimerizacijos paviršiaus tyrimas

Norėdami sukonstruoti MunI su reguliuojamu kataliziniu aktyvumu pasinaudojome žinoma erdvine struktūra, kuri rodo, kad kiekvienas subvienetas turi po Cys liekaną dimerizacijos paviršiuje (1B paveikslas). Mes pasiūlėme dvi galimybes reguliuoti MunI aktyvumą: (i) apriboti abiejų subvienetų judrumą sujungiant juos per Cys, esančius dimerizacijos paviršiuje, (1B paveikslas) ar (ii) suardyti dimerą į neaktyvius monomeres tuos pačius Cys modifikuojant fotochemiškai aktyviu junginiu. Sukonstruoti tokie REazių-TFO konjugatai, kurių aktyvumą galima reguliuoti, pastūmėtų restrikcijos fermentus vienu žingsniu arčiau praktinio pritaikymo genų taisymui. Prieš pradėdant MunI aktyvumo reguliavimo darbus naudinga būtų patikrinti Cys, esančių dimerizacijos paviršiuje, prieinamumą bei detaliau iširti baltymo stabilumą.

1.2.1. Cys123, esančių MunI dimerizacijos paviršiuje, prieinamumas cheminiams junginiams

Norint nustatyti tiolio grupių koncentraciją mėginyje naudojamas cheminis junginys Elmano reagentas (5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoinė rūgštis) arba DTNB) (Ellman, 1959). Cys titravimas su DTNB išskiria geltonos spalvos reakcijos produktą TNB^{2-} , kurio koncentracija gali būti matuojama spektrofotometriškai ($\lambda = 412 \text{ nm}$) (3A paveikslas) (Siksnys ir Pleckaityte, 1992). MunI Cys prieinamumas DTNB buvo tiriamas 20 μM MunI (kaip monomero) sumaišius su 200 μM 5,5'-DTNB Titravimo buferyje. Eksperimentas parodė, kad wt MunI Cys, esantys dimerizacijos paviršiuje, nėra prieinami (3B paveikslas).



3 paveikslas. MunI cisteinų prieinamumas cheminiams reagentams. (A) MunI dimerizacijos paviršiaus cisteinų reakcija su DTNB buvo stebima spektrofotometriškai prie $\lambda = 412 \text{ nm}$. (B) Modifikuotų cisteinų kiekis tenkantis vienam MunI monomerui neesant ir esant GdmCl.

Buvo nutarta, kad cheminio denatūranto pagalba MunI suardžius iki monomerų jo Cys prieinamumas DTNB turėtų pagerėti. Todėl buvo atliktas Cys titravimas su DTNB esant 1.5 M GdmCl. Šiuo atveju gautas pilnas Cys prieinamumas DTNB reagentui. Tam, kad nustatytume ar GdmCl indukuota MunI denatūracija vyksta per monomerizacijos stadiją buvo panaudota keletas tyrimo metodų.

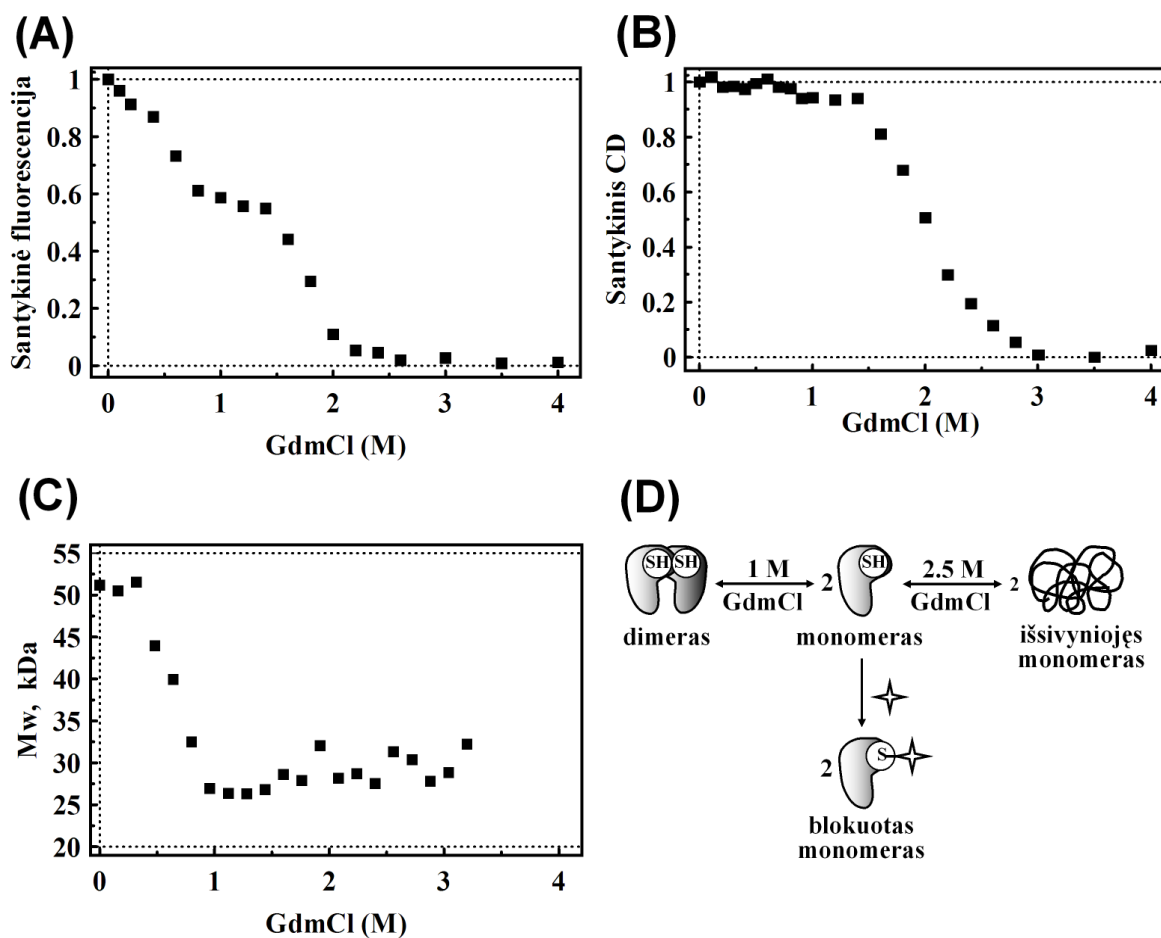
1.2.2. GdmCl įtakota MunI denatūracija

REazės MunI denatūracija didinant GdmCl koncentraciją buvo tiriama matuojant vidinės fluorescencijos ir cirkuliarinio dichroizmo (CD) signalų pokyčius bei atliekant analitinio ultracentrifugavimo (AUC) eksperimentus (4 paveikslas). MunI turi šešias triptofano liekanas, kurios gali būti sužadintos 295 nm šviesa ir vykdyti stiprią 335 nm šviesos fluorescenciją. Kuomet baltymas denatūruoja triptofanai iš hidrofobinės aplinkos patenka į hidrofilinę, dėl to silpnėja jų emisijos signalas. Norėdami stebėti GdmCl įtaką MunI vidinei fluorescencijai mes matavome 335 nm emisijos pokyčius, kur natyvaus ir denatūruoto MunI skirtumas labiausiai išreikštas. Didinant GdmCl koncentraciją tirpale fluorescencijos signalo silpnėjimas vyko dvejomis pakopomis: pirma tarp 0 ir 1 M GdmCl; antra tarp 1.5 ir 2.5 M GdmCl (4A paveikslas).

Norint nustatyti GdmCl įtaką MunI antrinei struktūrai CD signalas buvo pamatuotas esant toms pačioms denatūranto koncentracijoms. CD spektrai prie 222 nm šviesos, kur natyvių ir denatūruotų α -spiralių skirtumas labiausiai išreikštas, parodė, kad CD signalo pokyčiai įvyksta nuo 1.5 iki 3.0 M GdmCl, tuo tarpu tarp 0 ir 1.5 M GdmCl jokių reikšmingų signalo pokyčių nestebima (4B paveikslas). CD signalo pokytis rodo, kad GdmCl įtakoja α -spiralių struktūros praradimą. Šis tyrimas parodo, kad fluorescencijos sumažėjimas tarp 1.5 ir 2.5 M GdmCl sutampa su baltymo išsivyniojimu (4A ir 4B paveikslas).

Kitame etape MunI tirpalas su įvairiais GdmCl kiekiais buvo tiriamas AUC būdu. Gauti rezultatai parodė, kad nuo 0 iki 1 M GdmCl baltymo molekulinė masė sumažėjo nuo 51 kDa iki 26 kDa. Didesni GdmCl kiekiai (iki 3.3 M) MunI molekulinei masei didelės įtakos nedarė (4C paveikslas). Apibendrinus gautus rezultatus galima daryti išvada, kad pirmoje fluorescencijos signalo silpnėjimo pakopoje vyksta MunI dimero subyrėjimas iki monomerų, o antroje pakopoje vyksta baltymo polipeptidinės grandinės išsivyniojimas (4D paveikslas). Papildomi tyrimai parodė, kad ši MunI denatūracija yra grįžtama ir naujai susivyniojęs baltymas pasižymi tokiomis pačiomis DNR surišimo ir katalizinėmis savybėmis kaip ir nedenatūravęs MunI.

Oligomeriniai baltymai gali pirmiau disocijuoti į monomerus o po to išsivynioti (Miller ir Schildbach, 2003) arba abu procesai gali vykti vienu metu (Barry ir Matthews, 1999). Denatūracijos su GdmCl tyrimai parodė, kad MunI pirmiau disocijuoja į monomerus, o tik vėliau, esant didesnėms denatūranto koncentracijoms, išsivynioja baltymo polipeptidinė grandinė (4D paveikslas). Panašiai denatūruoja ir GdmCl paveikta tetramerinė REazė Bse634I (Zaremba ir kiti, 2005), o dimerinės REazės Bfil ir PvuII subyra į monomerus ir išsivynioja vienu metu (Dupureur ir Dominguez, 2001; Zaremba ir kiti, 2004).



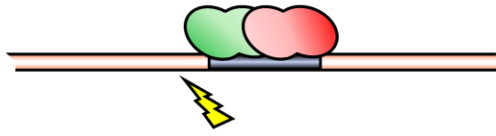
4 paveikslas. MunI denatūracija su GdmCl. Baltymo denatūracija buvo stebėta registruojant (A) fluorescencijos emisijos signalą esant 335 nm bangos ilgiui, (B) CD signalą esant 222 nm bangos ilgiui ir (C) vykdant AUC. (D) MunI denatūracijos su GdmCl schema. MunI monomerinė forma leidžia su fotochemine žyme blokuoti cisteinus, esančius dimerizacijos paviršiuje.

Pagal nustatytą MunI denatūracijos schemą (4D paveikslas) Cys123 aminorūgštys, esančios dimerizacijos paviršiuje, turėtų būti prieinamos cheminiams modifikatoriams esant 1.0-1.5 M GdmCl, kuomet baltymas subyra į monomeras. MunI titravimas su DTNB parodė, kad pridėjus 1.5 M GdmCl cisteinai tapo prieinami (3B paveikslas) ir galėtų būti blokuojami su fotocheminiais reagentais.

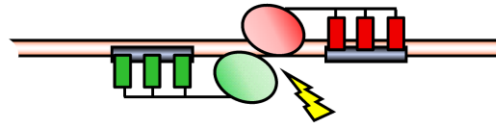
2. MunI aktyvumo reguliavimas

Pirmasis REazės-TFO konjugatas buvo pademonstruotas Eisenschmidt ir kolegų (Eisenschmidt ir kiti, 2005) (5D paveikslas). Viengrandinis REazės PvuII variantas scPvuII buvo sujungtas su TFO ir gautas konjugatas kirpo specifinį DNR taikinį *in vitro*, šalia kurio buvo tripleksą formuojanti seka (TFS). Tačiau toks REazės-TFO konjugatas turi ir „silpnąją“ pusę. DNR triplekso susidarymas vyksta daug lėčiau, nei REazė atpažįsta ir hidrolizuoja savo taikinį, o kadangi ląstelės terpėje yra Mg^{2+} jonų, kurie paprastai yra reikalingi REazės aktyvumui, tai restrikcijos fermentas pirmiau hidrolizuos savo taikinius nei spės įvykti TFO-TFS sąveika.

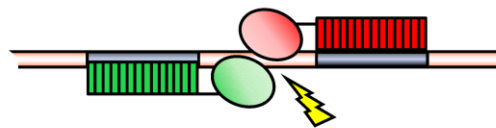
(A) Introninės endonukleazės



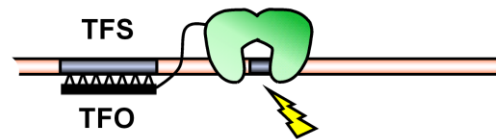
(B) Cinko pirštų nukleazės



(C) TALE nukleazės



(D) scPvuII-TFO

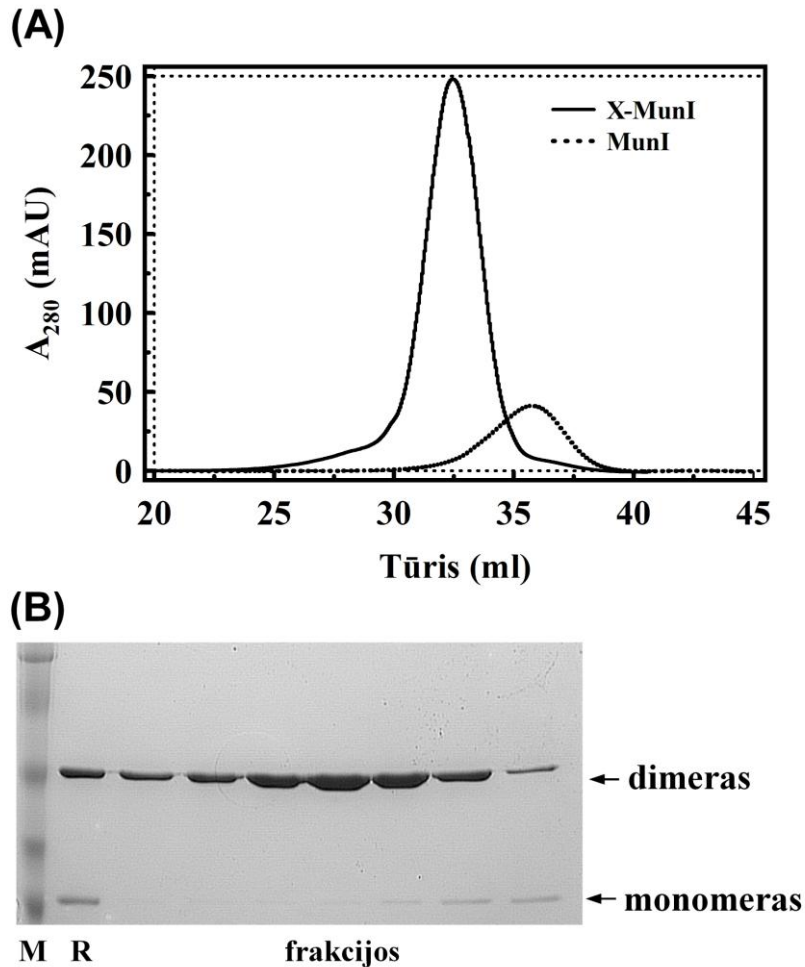


5 paveikslas. Endonukleazės genų taisymui. Gamtoje egzistuojančios introninės endonukleazės (A), ZPN, sudarytos iš nespecifinio FokI DNR hidrolizuojančio domeno, sujungto su DNR rišančiu domenu, paruoštu iš trijų cinko pirštų motyvų (B), ir TALE nukleazės, sudarytos iš nespecifinio FokI DNR hidrolizuojančio domeno, sujungto su DNR rišančiu TALE baltymu (C), buvo sėkmingai panaudotos genų taisymui per HR eukariotų ląstelėse. (D) REazės PvuII-TFO konjugatas atpažįsta dvigubą DNR taikinį, sudarytą iš tripleksą formuojančios sekos (TFS) ir REazės taikinio.

Todėl, norint REazės-TFO konjugatus pritaikyti genų taisymui *in vivo*, reikia sukonstruoti jų aktyvumo reguliavimo mechanizmus, kad DNR hidrolizė galėtų būti pradėta tik po DNR triplekso susidarymo. Tuo tikslu šiame darbe parodėme galimybę reguliuoti MunI aktyvumą (i) sudarant disulfidinių ryši tarp abiejų subvienetų ir (ii) blokuojant dimerizacijos paviršiuje esančius cisteinus su fotocheminiu junginiu.

2.1. MunI subvienetų sujungimas

Norint sujungti abu MunI subvienetus per disulfidinių ryši (1B paveikslas) pirmiausiai reikia suardyti baltymą iki monomerų, kad Cys taptų prieinami cheminiams reagentams. MunI dimero suardymas buvo vykdomas pridėjus 1M GdmCl (4D paveikslas) ir vario fenantrolino, kuris pagreitina cisteinų oksidaciją iki disulfidinio ryšio. Įvykusios reakcijos produktų analizė NDS-forezės būdu parodė, kad apie 90% MunI subvienetų susijungė per disulfidinių ryši (6B paveikslas, R takelis).

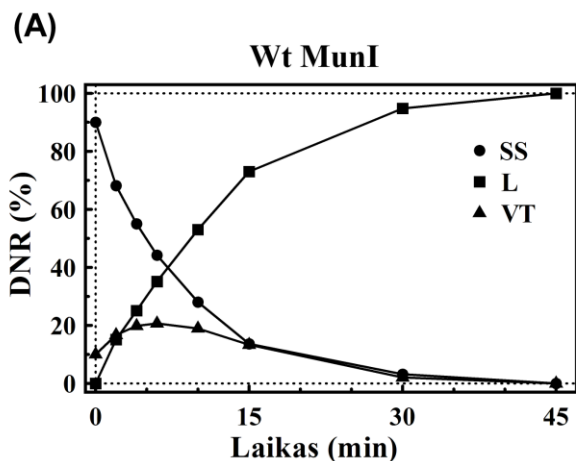


6 paveikslas. MunI subvienetų sujungimas. (A) Sujungto MunI gryninimo su 1 ml HiTrap Heparin kolonėle (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) eliucijos kreivės. Vientisa linija – sujungto MunI gryninimo eliucijos kreivė, punktyrinė linija – wt MunI gryninimo eliucijos kreivė. (B) Sujungto MunI gryninimo eliucijos frakcijų NDS-PAGE analizė: M – molekulinio svorio standartai, R – reakcijos mišinys bei surinktos eliucijos frakcijos.

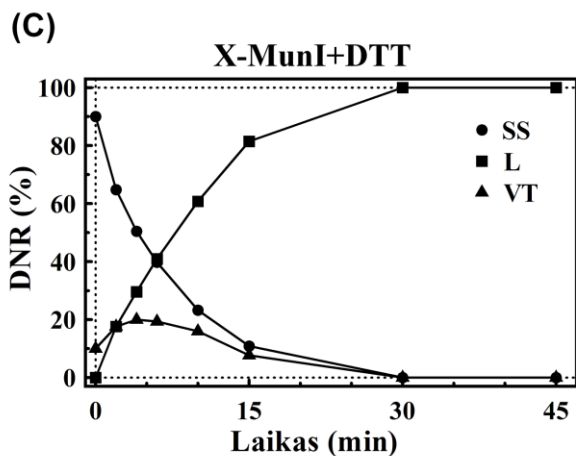
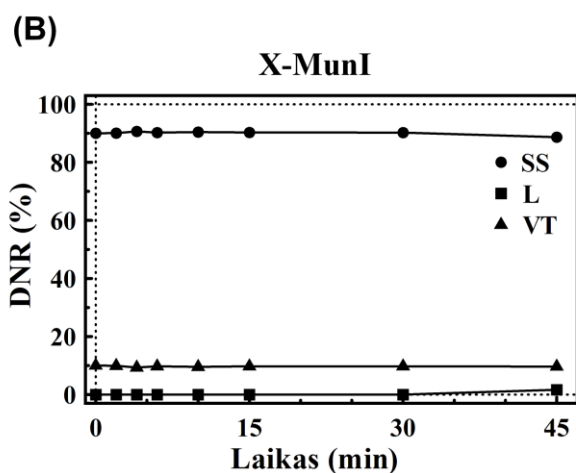
Susidaręs sujungtas MunI (X-MunI) buvo atskirtas nuo nesureagavusio wt MunI panaudojant afininę chromatografiją su heparinsefarozės kolonėle. X-MunI pasižymėjo silpnesne sąveika su heparinsefarozės sorbentu, todėl, vykdant NaCl gradientą neredukuojančiomis sąlygomis, jis atsiskyrė nuo kolonėlės pirmiau, nei wt MunI (6A paveikslas). Surinktų frakcijų NDS-frezė parodė, kad, esant denatūruojančioms sąlygoms, X-MunI gelyje juda kaip dimeras, o wt MunI - kaip monomeras (6B paveikslas).

2.1.1. DNR hidrolizė su X-MunI.

Norint ištirti X-MunI katalizinį aktyvumą buvo panaudota plazmidinė DNR, turinti vieną MunI taikinį. X-MunI ir DNR santykiu 1:2 buvo inkubuoti Reakcijos buferyje I 25 °C temperatūroje.



7 paveikslas. X-MunI katalizinis aktyvumas. 0.75 nM wt MunI (A), X-MunI (B) ir X-MunI+DTT (C) reakcija su 1.5 nM plazmidinės DNR, turinčios vieną MunI taikinį. SS – superspiralizuota DNR, VT – viengrandininį trūkį turinti DNR, L – linijinė DNR.

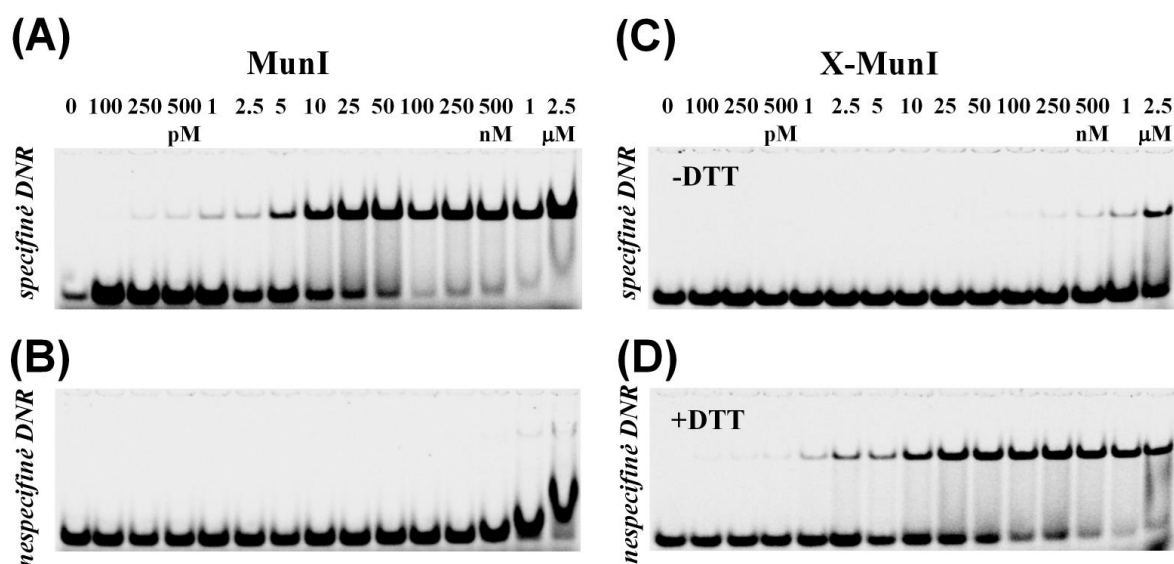


Įvairiais laikais sustabdytos reakcijos pavyzdžių analizė parodė, kad, priešingai nei wt MunI atveju (7A paveikslas), X-MunI visiškai nehidrolizavo DNR (7B paveikslas). Tačiau, į reakcijos mišinį pridėjus reduktoriaus DTT, disulfidinis ryšys suardomas ir fermento katalizinis aktyvumas atsistato (7C paveikslas).

2.1.2. X-MunI sąveikos su DNR tyrimas

Tam, kad nustatytume X-MunI susirišimo su specifine DNR savybes, buvo panaudotas elektroforezinio judrumo poslinkio metodas. Šiam tyrimui naudoti radioaktyviu izotopu ^{33}P pažymėti 22/19 bp oligodupleksai, turintys MunI taikinį, ir 22/22 bp oligodupleksai, neturintys MunI taikinio. Didėjantys fermentų kiekiai buvo sumaišyti su 2 nM specifinio ir nespecifinio oligoduplekso, užnešti ant poliakrilamidinio

gelio (PAAG) ir praleista elektroforezė. Gautų rezultatų analizė parodė, kad priešingai wt MunI, kuris sudaro baltymo-DNR kompleksą su specifine DNR ($K_d \sim 10$ nM) (8A paveikslas), ir nesąveikauja su nespecifine DNR (8B paveikslas), X-MunI pasižymėjo smarkiai pablogėjusia sąveika su specifine DNR ($K_d > 2500$ nM) (8C paveikslas). Šis eksperimentas parodė, kad X-MunI prarado katalizinį aktyvumą dėl smarkiai sumažėjusio gebėjimo sudaryti kompleksą su specifine DNR. Panašiai kaip ir prieš tai aprašytuose DNR hidrolizės tyrimuose, reduktoriaus DTT pridėjimas atstato fermento gebėjimą sąveikauti su specifine DNR ($K_d \sim 25$ nM) (8D paveikslas).



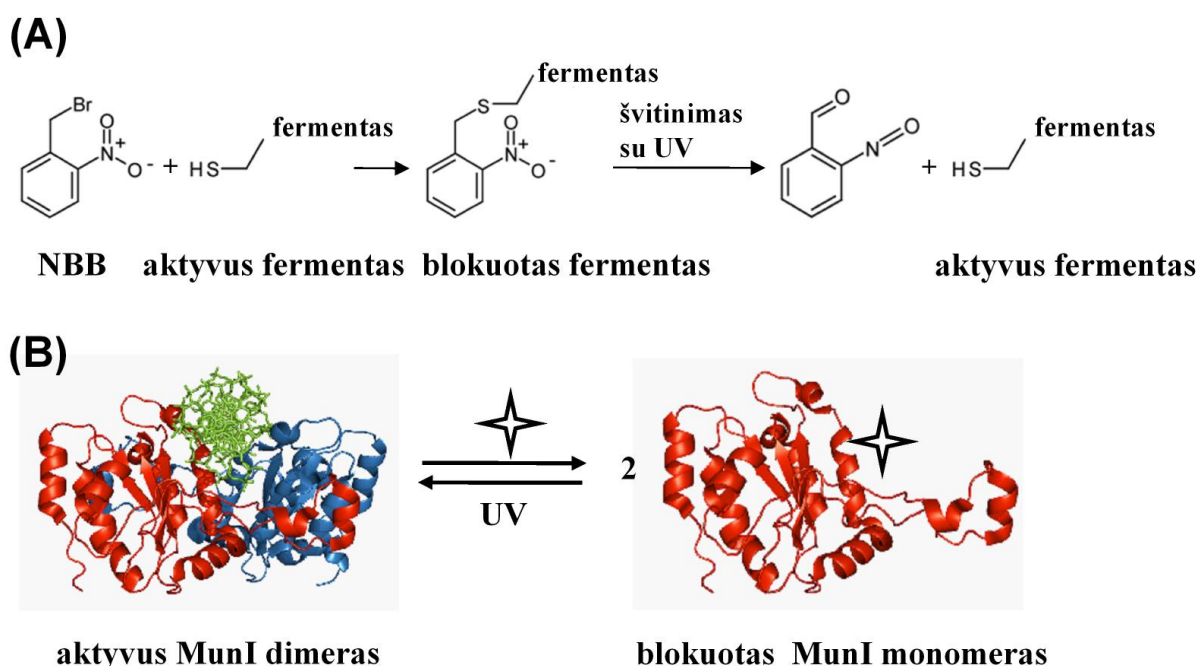
8 paveikslas. Wt (A ir B), X-MunI (C) ir X-MunI+DTT (D) MunI sąveika su specifine ir nespecifine DNR. 2 nM radioaktyvia žyme pažymėto oligoduplekso buvo sumaišyta su didėjančiais baltymų kiekiais. Baltymų-DNR sąveika buvo tirta elektroforezinio judrumo poslinkio metodu. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinti, autoradiografuoti ir analizuoti naudojant Cyclone Storage Phosphor sistemą ir OptiQuant Image Analysis Software, Version 03.00 (Packard Instrument Co).

X-MunI katalizinio aktyvumo praradimas gali būti susijęs su konformaciniu pokyčiu dėl atsiradusio disulfidinio ryšio dimerizacijos paviršiuje. MunI erdvinė struktūra su DNR (Deibert ir kiti, 1999) rodo, kad atstumas tarp į priešingas puses nukreiptų SH grupių sieros atomų yra ~ 8 Å (1B paveikslas). Disulfidinio ryšio ilgis yra ~ 2.1 Å, todėl šių cisteinų oksidavimas iki disulfidinio ryšio įvedė žymius konformacinius pokyčius, kurie greičiausiai sugadino MunI DNR surišimo ir hidrolizės aktyvumus. Todėl disulfidinis ryšys MunI dimerizacijos paviršiuje veikia kaip „oks-red“ aktyvumo jungiklis, kuris reguliuoja MunI katalizinį aktyvumą.

2.2. MunI dimerizacijos paviršiaus blokavimas

Baltymų reguliavimas šviesa yra nauja ir daug žadanti strategija, leidžianti išoriškai kontroliuoti biologinius procesus. Tai gali būti vykdoma blokuojant biomolekules fotochemiškai aktyviu junginiu. Tikėtina, kad MunI dimerizacijos paviršiuje prikabinus šviesai jautrų junginį jis erdviškai neleis baltymui dimerizuotis paversdamas jį neaktyviu monomeru (9A ir B paveikslas). Tokiam MunI dimerizacijos paviršiaus blokavimui buvo pasirinkta ta pati C123 a.r., kuri buvo naudota baltymo sujungimui. Šie cisteinai yra

dimerizacijos spiralėse, arti vienas kito, todėl atrodo tinkami kandidatai cheminiam modifikavimui. Cisteinų blokavimui cheminiu reagentu buvo pasirinktas 2-nitrobenzil bromidas (NBB), kurį galima priversti nudisocijuoti pašvietus UV šviesa.

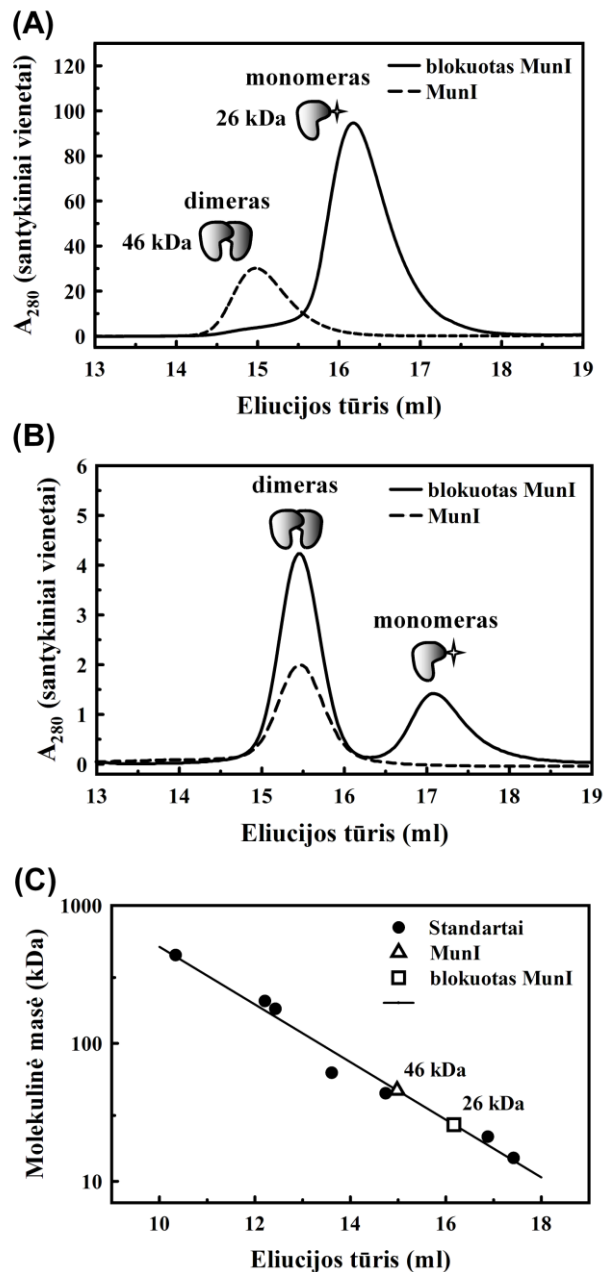


9 paveikslas. Šviesa reguliuojamos REazės konstravimas. (A) Fermento blokavimo su NBB bei reaktyvavimo su UV šviesa schema. (B) Šviesa reguliuojamo MunI konstravimas. Dimerizacijos paviršiaus cisteinų (C123) modifikavimas su NBB. Susidaręs neaktyvus monomeras švitinamas 330 nm bangos ilgio šviesa, fotocheminis blokas nudisocijuoja leisdamas susidaryti aktyviam MunI dimerui.

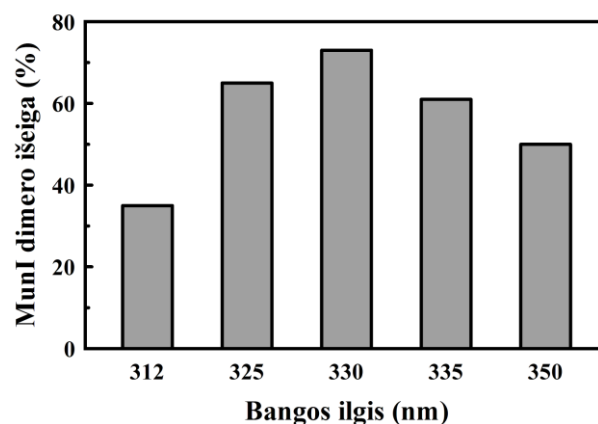
Cisteinų blokavimas buvo vykdomas per naktį 4 °C temperatūroje, esant 1M GdmCl. Šis denatūrantas suardo dimerą iki monomerų taip atverdamas priėjimą prie modifikuojamų cisteinų (4D paveikslas). Po reakcijos mišinys buvo dializuotas nuo GdmCl, o gautas blokuotas MunI buvo grynintas naudojant gelfiltraciją (10A paveikslas). Priešingai nei wt MunI, kuris yra dimeras (~46kDa), blokuotas MunI buvo monomeras (~26kDa). Po blokavimo reakcijos tik apie ~10% liko dimerinio MunI (10A paveikslas), o blokuoto MunI išėiga siekė ~90% (10A, C paveikslas).

2.2.1. Blokuoto MunI aktyvacija

Norint aktyvuoti blokuotą Mun, baltymo tirpalas buvo švitinamas nuo 312 iki 350 nm bangos ilgio UV šviesa 1 val. 4 °C temperatūroje. Kadangi blokuotas MunI yra monomeras, o aktyvuotas tampa dimeru, fermento aktyvavimo išėiga buvo nustatinėjama gelfiltracijos būdu (10B paveikslas).



10 paveikslas. MunI blokavimas su 2-nitrobenzil bromidu (NBB) (A) ir aktyvavimas su UV šviesa (B) matuojamas gelfiltracijos būdu. (A) MunI blokavimas su NBB paverčia jį monomeru. Vientisa linija – MunI blokavimo reakcijos produktai, punktyrinė linija – wt MunI. (B) Švitinant blokuotą MunI su UV šviesa susidaro dimerinis baltymas. Vientisa linija – MunI aktyvavimo reakcijos produktai, punktyrinė linija – wt MunI. (C) Wt ir blokuoto MunI molekulinės masės buvo paskaičiuotos naudojantis kalibracine kreive, sudaryta nustatius žinomos molekulinės masės standartinių baltymų elucijos tūrius.

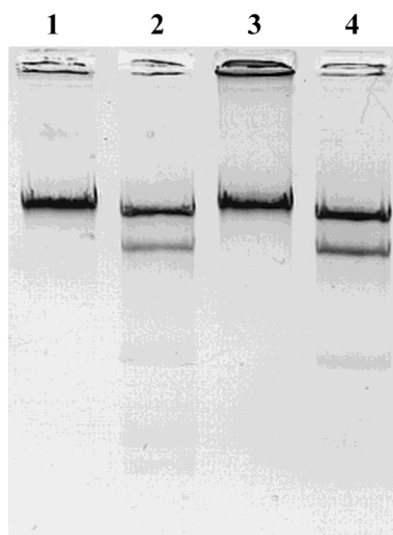


11 paveikslas. MunI aktyvavimo išeiga švitinant įvairių bangos ilgių šviesa. Aktyvavimo išeiga buvo nustatyta gelfiltracijos būdu įvertinant susidariusio dimero frakciją.

Gauti rezultatai parodė, kad didžiausia dimero išeiga (~70%) gauta švitinant 330 nm bangos ilgio UV šviesa (11 paveikslas).

2.2.2. DNR hidrolizė su blokuotu ir aktyvuotu MunI.

Tam, kad nustatytume blokuoto ir aktyvuoto MunI DNR hidrolizės aktyvumus buvo panaudota λ fago DNR.

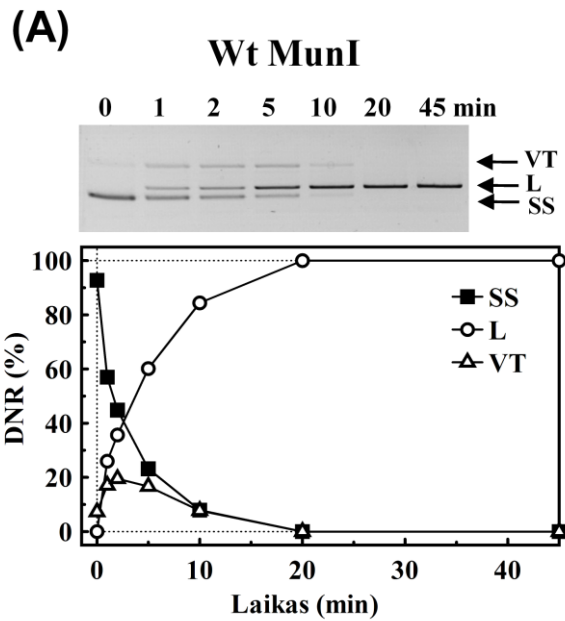


12 paveikslas. λ fago DNR hidrolizė su blokuotu ir aktyvuotu MunI. 1 – tik DNR substratas, 2 – DNR hidrolizė su wt MunI, 3 – DNR hidrolizė su blokuotu MunI, 4 – DNR hidrolizė su aktyvuotu MunI.

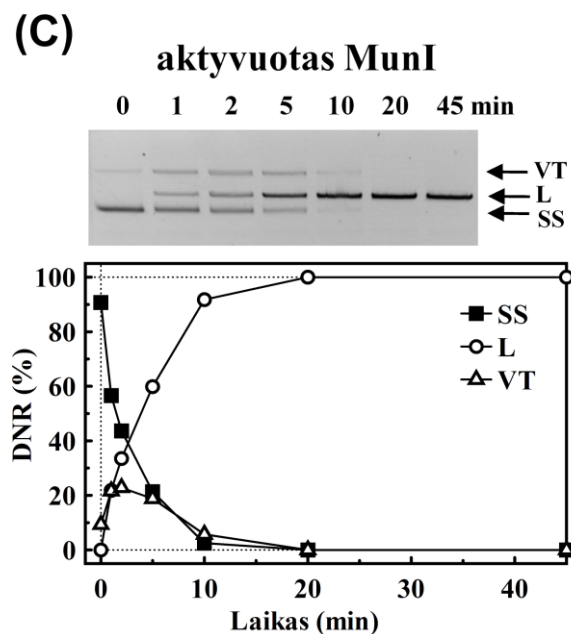
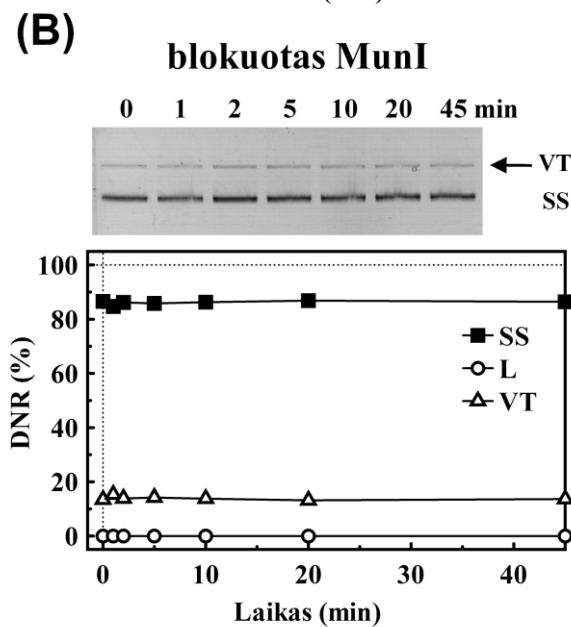
400 nM wt, blokuoto ir aktyvuoto MunI buvo sumaišyta su 1 μ g λ fago DNR Reakcijos buferyje I 15 min. 37°C temperatūroje. Reakcijos produktų analizė agarozės gelyje parodė, kad blokuotas MunI yra visiškai neaktyvus, o aktyvuotas MunI atgavo gebėjimą hidrolizuoti DNR tokiu pačiu specifiskumu kaip ir wt MunI (12 paveikslas).

2.2.3. Plazmidinės DNR hidrolizė su blokuotu ir aktyvuotu MunI

Siekiant detaliau ištirti blokuoto ir aktyvuoto MunI katalizinį aktyvumą DNR hidrolizės eksperimentai buvo atlikti naudojant superspiralizuotą plazmidinę DNR, turinčią vieną MunI taikinį. 0.75 nM wt MunI ir 1.5 nM blokuoto ir aktyvuoto MunI buvo sumaišyta su 1.5 nM plazmidinės DNR Reakcijos buferyje I esant 25 °C temperatūrai. Esant vienodoms baltymo ir DNR koncentracijoms blokuotas MunI buvo visiškai neaktyvus - plazmidėje neatsirado nei dvigrandininių nei viengrandininių trūkių (13B paveikslas). Tačiau, aktyvuoto MunI atveju, plazmidinės DNR hidrolizės profilis buvo toks pat kaip ir su 2 kartus mažesniu wt MunI kiekiu (13A, C paveikslas). Šis tyrimas parodo, kad MunI aktyvacija siekia ~50%.

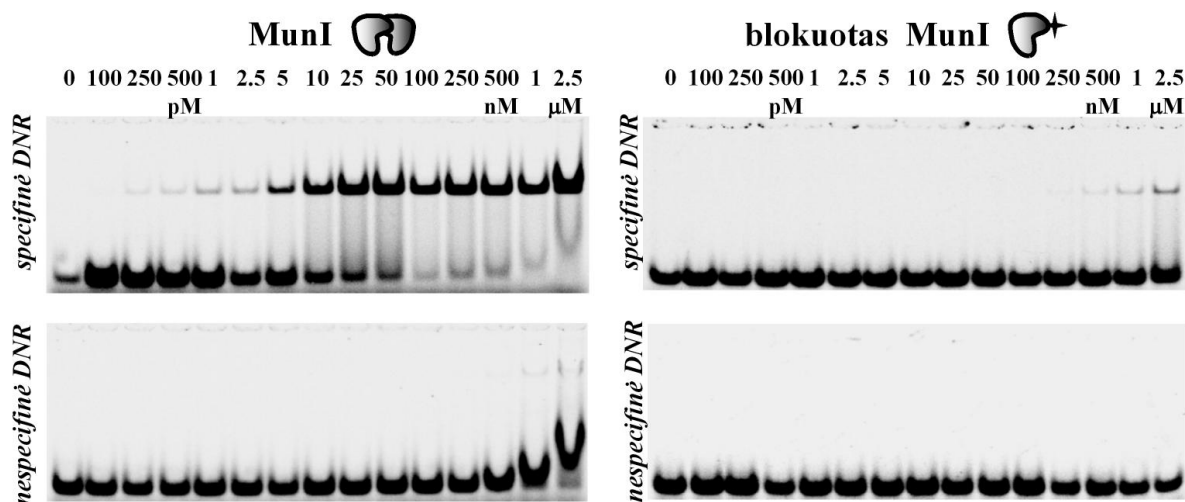


13 paveikslas. MunI fotoaktyvacija. (A), (B) ir (C) rodo plazmidinės DNR, turinčios vieną MunI taikinį, hidrolizę su wt, blokuotu ir aktyvuotu MunI. Kinetiniai eksperimentai atlikti naudojant 0.75 nM wt MunI ir 1.5 nM blokuoto ir aktyvuoto MunI su 1.5 nM plazmidinės DNR. SS – superspiralizuota DNR, VT – viengrandininį trūkį turinti DNR, L – linijinė DNR.



2.2.4. Blokuoto MunI sąveikos su DNR tyrimas

Blokuoto MunI susirišimo su specifine DNR savybės buvo tiriamos elektroforezinio judrumo poslinkio metodu.



14 paveikslas. Wt ir blokuoto MunI sąveika su specifine ir nespecifine DNR. 2 nM radioaktyvia žyme pažymėto oligoduplekso buvo sumaišyta su didėjančiais baltymų kiekiais. Baltymų-DNR sąveika buvo tirta EMSA metodu. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinti, autoradiografuoti ir analizuoti naudojant Cyclone Storage Phosphor sistemą ir OptiQuant Image Analysis Software, Version 03.00 (Packard Instrument Co).

Šiam tyrimui naudoti radioaktyviu izotopu ^{33}P pažymėti 22/19 bp oligodupleksai, turintys MunI taikinį, ir 22/22 bp oligodupleksai, neturintys MunI taikinio. Didėjantys fermentų kiekiai buvo sumaišyti su 2 nM specifinio ir nespecifinio oligoduplekso, užnešti ant poliakrilamidinio gelio (PAAG) ir praleista elektroforezė. Gautų rezultatų analizė parodė, kad, priešingai nei wt MunI atveju ($K_d \sim 10^{\circ}\text{nM}$), blokuotas MunI pasižymėjo labai smarkiai sumažėjusia sąveika su specifine DNR ($K_d > 2500 \text{ nM}$) (14 paveikslas).

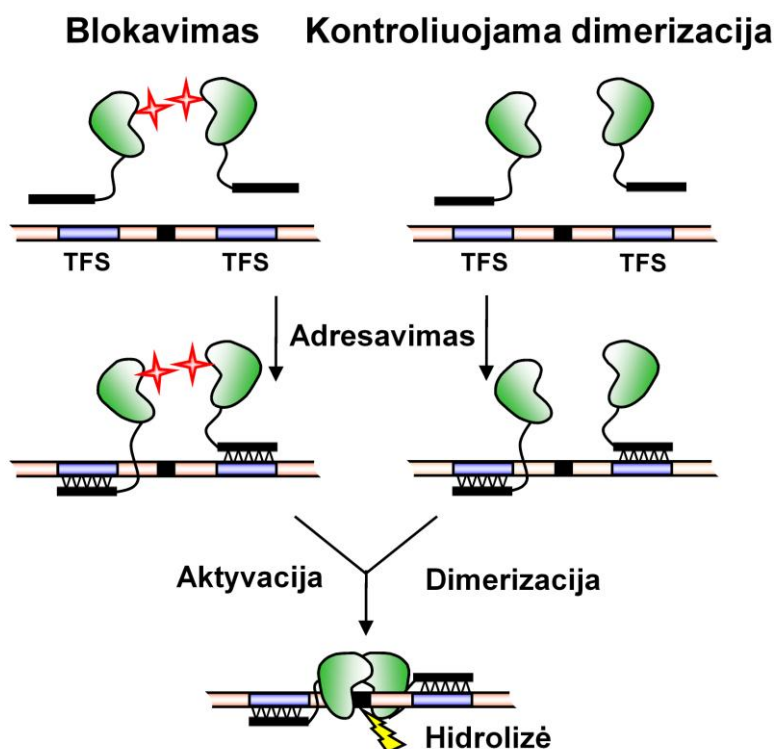
2.2.5. MunI blokavimas: išvados ir praktinis pritaikymas

DNR hidrolizės tyrimai bei gelfiltracijos eksperimentai parodė, kad MunI cisteinų, esančių dimerizacijos paviršiuje, cheminis blokavimas (išeiga ~90%) inaktyvuoja nukleazę, neleisdamas susijungti į aktyvų dimerą (10A ir 13B paveikslas). Elektroforezinio judrumo poslinkio eksperimentų metu paaiškėjo, kad toks monomerinis MunI darinys net nesąveikauja su specifine DNR (14 paveikslas). Tam, kad aktyvuotume blokuotą MunI, buvo pašviesta UV šviesa ir tuomet cheminis blokas nudisocijuoja nuo baltymo. Gelfiltracijos būdu stebimas iki 70% aktyvacijos išeiga, o DNR hidrolizės eksperimentai rodo iki 50% aktyvumo atsistatymą.

Aktyvumo reguliavimo strategija naudojant fotocheminį blokavimą gali būti pritaikyta ir kitiems oligomeriniams fermentams. Natūraliai esantys arba mutagenėzės būdu įvesti cisteinai, esantys oligomerizacijos arba substrato surišimo vietoje, gali būti chemiškai blokuojami su NBB tam, kad būtų inaktyvuoti. Tokių fermentų katalizinis aktyvumas gali būti atstatomas pašvietus UV šviesa.

3. Kontroliuojamų restrikcijos endonukleazių konstravimas

Individualių genų, esančių kompleksiniame genome, taisymui reikalingos itin tikslios ir specifinės endonuklezės. Restrikcijos endonuklezės (REazės) yra viena iš potencialių nukleazių klasių, kurios gali būti pritaikytos šiems darbams. REazės pasižymi stipriu specifiškumu savo DNR taikiniui, yra maži baltymai, todėl gali būti nesunkiai transportuojami į ląsteles. ScPvuII-TFO konjugato pavyzdys parodė, kad yra įmanoma nukreipti restrikcijos endonukleazę prie norimo DNR taikinio (Eisenschmidt ir kiti, 2005), tačiau norint REazes pritaikyti *in vivo* reikia sugebėti reguliuoti jų aktyvumą.



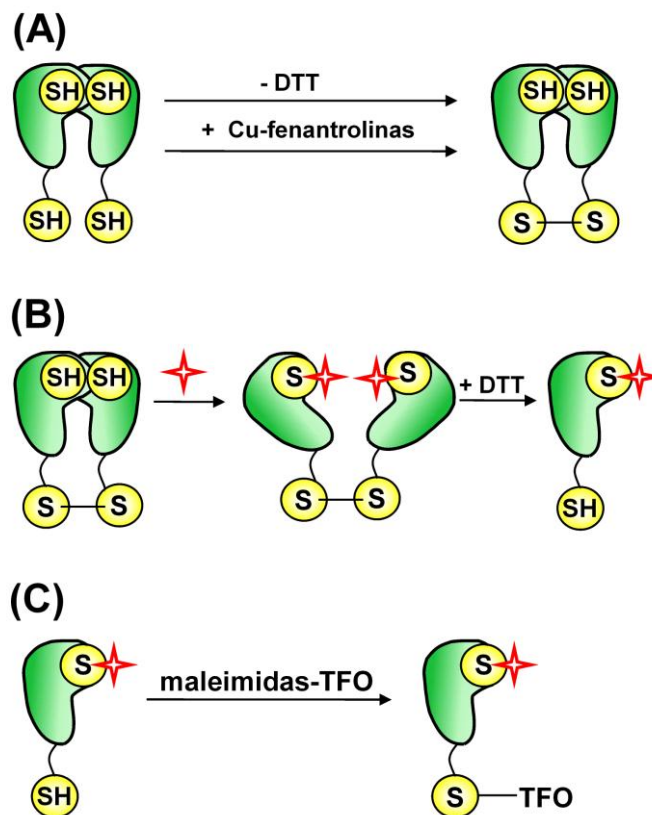
15 paveikslas. Reguliuojamo aktyvumo REazės-TFO konjugato konstravimo strategija. Aktyvus REazės homodimeras gali būti inaktyvuotas chemiškai blokuojant (kairė pusė, „blokavimas“) arba mutagenizuojant (dešinė pusė, „kontroluojama dimerizacija“) dimerizacijos paviršių. Po DNR triplekso susidarymo blokuota endonukleazė aktyvuojama pašalinant bloką, o susilpninto dimerizacijos paviršiaus nukleazė sudaro dimerą dėl artimos monomerų lokalizacijos vienas kito atžvilgiu.

Šiame darbe buvo panaudotas tripleksą formuojantis oligonukleotidas (TFO), kuris veikia kaip papildomas su DNR sąveikaujantis domenai. Toks TFO, prijungtas prie REazės, apsprendžia jos nukreipimą prie reikiamo DNR taikinio, taip padidindamas nukleazės specifiškumą. Taip pat čia pateikiamos dvi strategijos, kaip galima būtų reguliuoti REazės-TFO konjugato aktyvumą: (i) cheminio blokavimo metodas, kuomet įvedamos inaktyvuojančios modifikacijos, kurios gali būti pašalintos (su šviesa) po to, kai susiformuoja DNR tripleksas (15 paveikslas, „blokavimas“), (ii) reguliuojama oligomerizacija, kuomet kataliziškai neaktyvūs REazės monomerai per TFO nukreipiami prie to paties taikinio (šalia vienas kito), kad galėtų dimerizuotis (aktyvuotis) (15 paveikslas, „kontroluojama dimerizacija“).

3.1. Blokuotos REazės-TFO konjugato konstravimas

Blokuoto REazės-TFO konjugato konstravimui buvo pasirinkta restrikcijos endonukleazė MunI, kuri yra gerai charakterizuota ir struktūriškai (Deibert ir kiti, 1999) ir funkciškai (Lagunavicius ir kiti, 1997; Sasnauskas ir kiti, 1999). Ši endonukleazė yra homodimerinė, atpažįsta palindrominę DNR seką 5'-C/AATTG-3' ir hidrolizuoja ją iš abiejų pusių naudodama Mg^{2+} jonus.

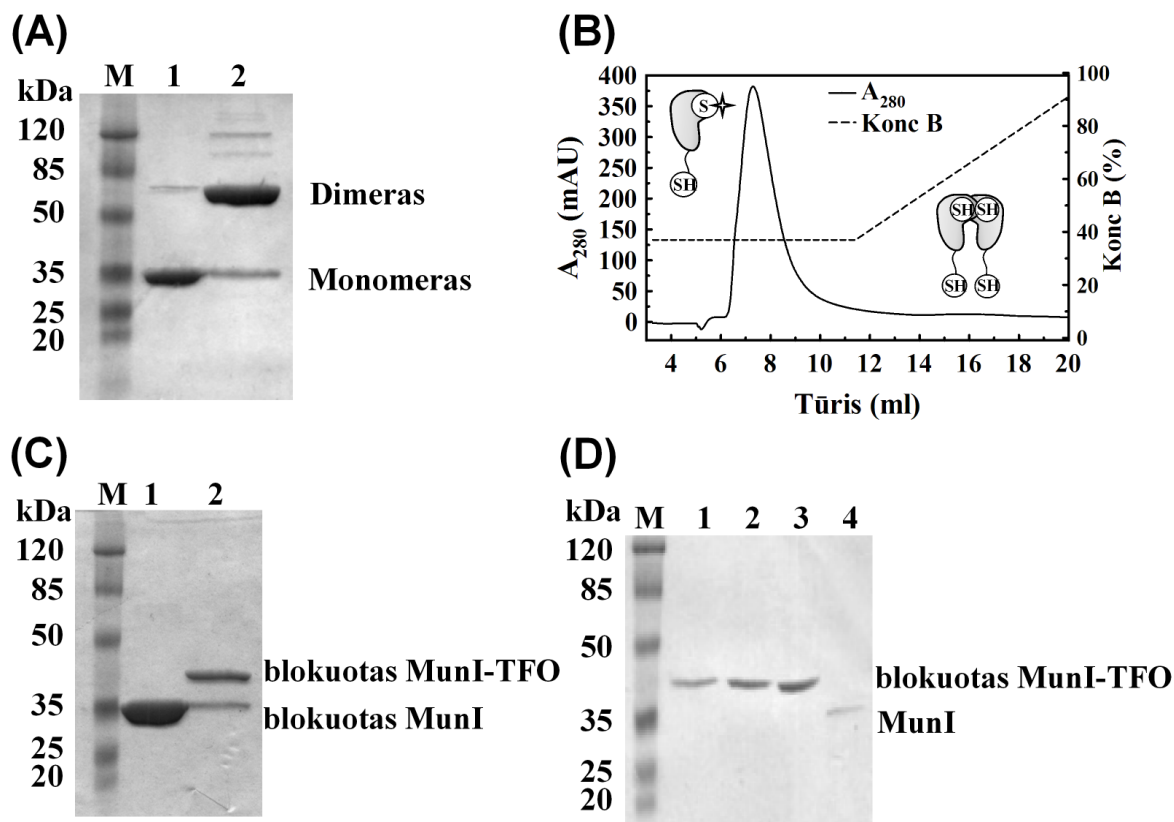
Natūraliai MunI dimeras turi dvi Cys liekanas (po vieną monomere) 123 pozicijoje (1B paveikslas). Šie cisteinai yra dimerizacijos paviršiuje, todėl yra tinkami taikiniai fotocheminiam fermento blokavimui. MunI dimerą galima suardyti su 1 M GdmCl (4D paveikslas), o C123 blokuoti su NBB ir gauti neaktyvų monomerą, kuris gali būti reaktyvuotas su šviesa (9B paveikslas). TFO prijungimui buvo pasirinkta cisteinų chemija. Tuo tikslu MunI C-gale buvo sukonstruotas His₆ inkaras (His₆-MunI), kurio paskutinė a.r. yra Cys, reikalingas TFO prijungimui (Eisenschmidt ir kiti, 2005).



16 paveikslas. Blokuoto MunI-TFO konjugato konstravimas. Pirmiausiai, C-galiniai cisteinai buvo apsaugoti nuo tolimesnių modifikacijų, sudarant tarp jų disulfidinę jungtį (A). Po to cisteinai, esantys dimerizacijos paviršiuje, buvo blokuoti su 2-nitrobenzilbromidu (B). Vėliau, pridėjus DTT, suardomas disulfidinis ryšys tarp C-galinių cisteinų. Gautas monomerinis blokuotas MunI, tinkamas tripleksą formuojančio oligonukleotido prijungimui (C).

Norint selektyviai modifikuoti dimerizacijos paviršiaus cisteinus su fotochemine žyme, o C-galinius cisteinus sujungti su TFO buvo pasinaudota skirtingu šių cisteinų prieinamumu cheminiams reagentams. Pirmiausiai His₆-MunI preparatas (be reduktoriaus) buvo inkubuotas su vario fenantrolinu tam, kad C-gale esantys cisteinai sudarytų disulfidinę jungtį ir būtų apsaugoti nuo tolimesnių modifikacijų (16A paveikslas). NDS forezė parodė, kad paveikus vario fenantrolinu apie 95% His₆-MunI

susijungė per disulfidinį ryšį (17A paveikslas). Ankstesni eksperimentai su wt MunI parodė, kad tokiomis sąlygomis cisteinai, esantys dimerizacijos paviršiuje, nepasiekia vienas kito ir disulfidinio ryšio beveik nesudaro (<5%, neskelbti duomenys).



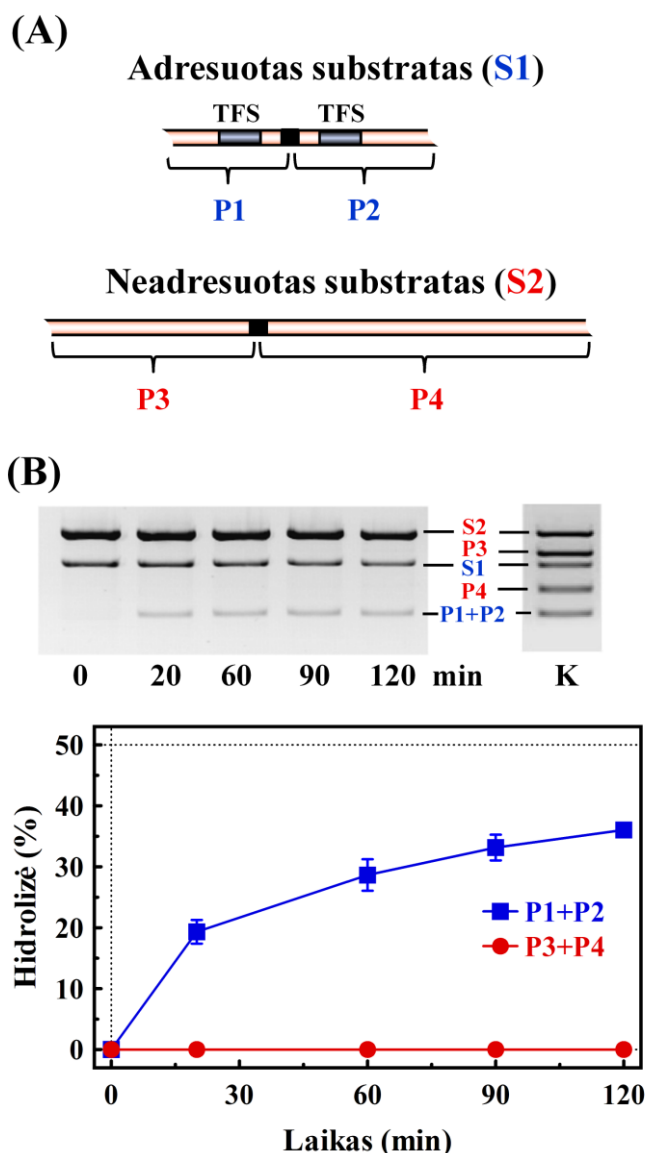
17 paveikslas. Blokuoto MunI-TFO konjugato konstravimas. (A) His₆-MunI (1) ir His₆-MunI po disulfidinio ryšio sudarymo reakcijos (2) NDS forezė. „Sujungto“ MunI išeiga ~95%. (B) Blokuoto monomerinio MunI atskyrimas nuo neblokuoto dimerinio MunI panaudojant 1ml HiTrap Heparin kolonėlę (GE Healthcare, Uppsala, Švedija). (C) Blokuoto monomerinio MunI NDS forezė prieš (1) ir po (2) sujungimo su tripleksą formuojančiu oligonukleotidu. (D) Blokuoto MunI-tripleksą formuojančio oligonukleotido NDS forezės analizė. 1, 2 ir 3 atitinka 1, 2 ir 3 μ l išgryninto konjugato, 4 - 50 ng His₆-MunI.

Kitame etape vyko cisteinų (C123), esančių dimerizacijos paviršiuje, blokavimas su 2-nitrobenzilbromidu (NBB). Tam, kad C123 būtų prieinami fotocheminei modifikacijai, buvo pridėta 1 M GdmCl, kuris atveria MunI dimerizacijos paviršių (16B paveikslas). Į reakcijos mišinį įdėtas NBB modifikavo cisteinus, esančius MunI dimerizacijos paviršiuje, o C-galiniai cisteinai buvo apsaugoti nuo modifikacijos dėl sudaryto disulfidinio ryšio. Po reakcijos su NBB buvo vykdoma dializė tam, kad pašalintume GdmCl bei fotocheminio blokatoriaus perteklių. Pridėjus reduktoriaus DTT buvo gautas monomerinis blokuotas MunI, tinkamas tripleksą formuojančio oligonukleotido prijungimui. Šio blokuoto monomerinio MunI gryninimas nuo neblokuoto dimerinio MunI buvo vykdomas panaudojant 1ml HiTrap Heparin kolonėlę (GE Healthcare, Uppsala, Švedija) ir buferius su pH 6.0 (17B paveikslas). TFO prijungimas prie blokuoto MunI buvo vykdomas taip kaip aprašyta pagal Eisenschmidt ir kolegos (Eisenschmidt ir kiti, 2005) (16C paveikslas). Pirmiausiai, TFO buvo sujungtas su bifunkciniu agentu GMBS N-[γ -maleimidobutiriloksi]sukcinimido esteriu per amidinę jungtį tarp TFO 5'

galinės C₁₂-amino grupės bei GMBS sukcinimido grupės. Gautas TFO-GMBS junginys buvo prijungtas prie blokuoto monomerinio MunI C-galinio cisteino per GMBS maleimido grupę (16C ir 17C paveikslai). Gautas blokuoto MunI-TFO konjugatas buvo išgrynintas nuo nesureagavusio MunI bei TFO pertekliaus panaudojant jonų mainų chromatografiją (17D paveikslas). Sukonstruotas blokuoto MunI-TFO konjugatas buvo taip pat kataliziškai neaktyvus (neskelbti duomenys) kaip ir blokuotas MunI (12 ir 13B paveikslai).

3.1.1. DNR hidrolizė su blokuoto MunI-TFO konjugatu

Blokuoto MunI-TFO konjugato sąveikos su DNR stochiometrija skiriasi nuo scPvuII-TFO, kuri buvo aprašyta Eisenschmidt ir kolegų (Eisenschmidt ir kiti, 2005). Viena scPvuII-TFO molekulė turi du katalizinius centrus ir gali atpažinti bei hidrolizuoti DNR turinčią PvuII taikinį su šalia esančia viena TFS. Blokuoto MunI-TFO molekulė turi tik vieną katalizinį centrą, todėl dvi tokios molekulės turi atsirasti prie to paties MunI atpažinimo taikinio, kad galėtų sudaryti aktyvų dimerą, galintį hidrolizuoti DNR. Tuo tikslu reikalingas MunI taikiny, kuris būtų apsuptas dviem TFS.



18 paveikslas. Tikslinį taikinį turinčios DNR hidrolizė su blokuoto MunI-TFO konjugatu.

(A) DNR substratai. 1880 bp tikslinį taikinį turintis DNR substratas, turintis MunI atpažinimo taikinį 5'-CAATTG-3' apsuptą dviem TFS ir 3675 bp įprastinis DNR substratas, turintis MunI atpažinimo taikinį ir jokių TFS. (B) DNR hidrolizė. Tikslinį ir įprastą taikinį turinčio substrato mišinys buvo sumaišytas su blokuoto MunI-TFO konjugatu Triplekso buferyje I ir inkubuotas esant 4 °C temperatūrai leidžiant susidaryti DNR tripleksams. Po švitinimo su UV šviesa DNR hidrolizė buvo paleista mišinį praskiedus su Reakcijos buferiu IV. Gauta tik tikslinį taikinį turinčio substrato hidrolizė (P1+P2). K – kontrolinis takelis, kur abu substratai yra perkirpti per MunI taikinius su wt MunI. Grafiko taškai yra gauti atlikus tris nepriklausomus eksperimentus ir paėmus jų vidurkį. Paklaida ± 1%.

Blokuoto MunI-TFO konjugato aktyvumas ir specifiskumas buvo tiriamas naudojant 1880 bp ir 3675 bp DNR fragmentus. 1880 bp fragmentas turi trigubą tikslinį atpažinimo taikinį, sudarytą iš dviejų TFS, esančių per 9 bp aukščiau ir žemiau nuo MunI atpažinimo taikinio (18A paveikslas). 3675 bp fragmentas turi tik MunI atpažinimo taikinį ir jokių TFS. Kontrolinis eksperimentas su wt MunI parodė, kad abiejų fragmentų MunI taikiniai yra hidrolizuojami vienodai (18B paveikslas, K). Abiejų 1880 ir 3675 bp DNR fragmentų inkubavimas su blokuoto MunI-TFO konjugatu Triplekso buferyje I, reakcijos mišinio švitinimas su UV šviesa ir tolimesnis skiedimas su Reakcijos buferiu IV parodė tikslinio MunI taikinio hidrolizę 1880 bp DNR fragmente; 3675 bp fragmente jokios hidrolizės nepastebėta (18B paveikslas). Taigi, sėkmingai pritaikant MunI aktyvumo blokavimą bei nukreipimą prie norimo taikinio prijungiant TFO, buvo sukonstruotas itin specifiškas ir šviesa aktyvuojamas DNR hidrolizės įrankis.

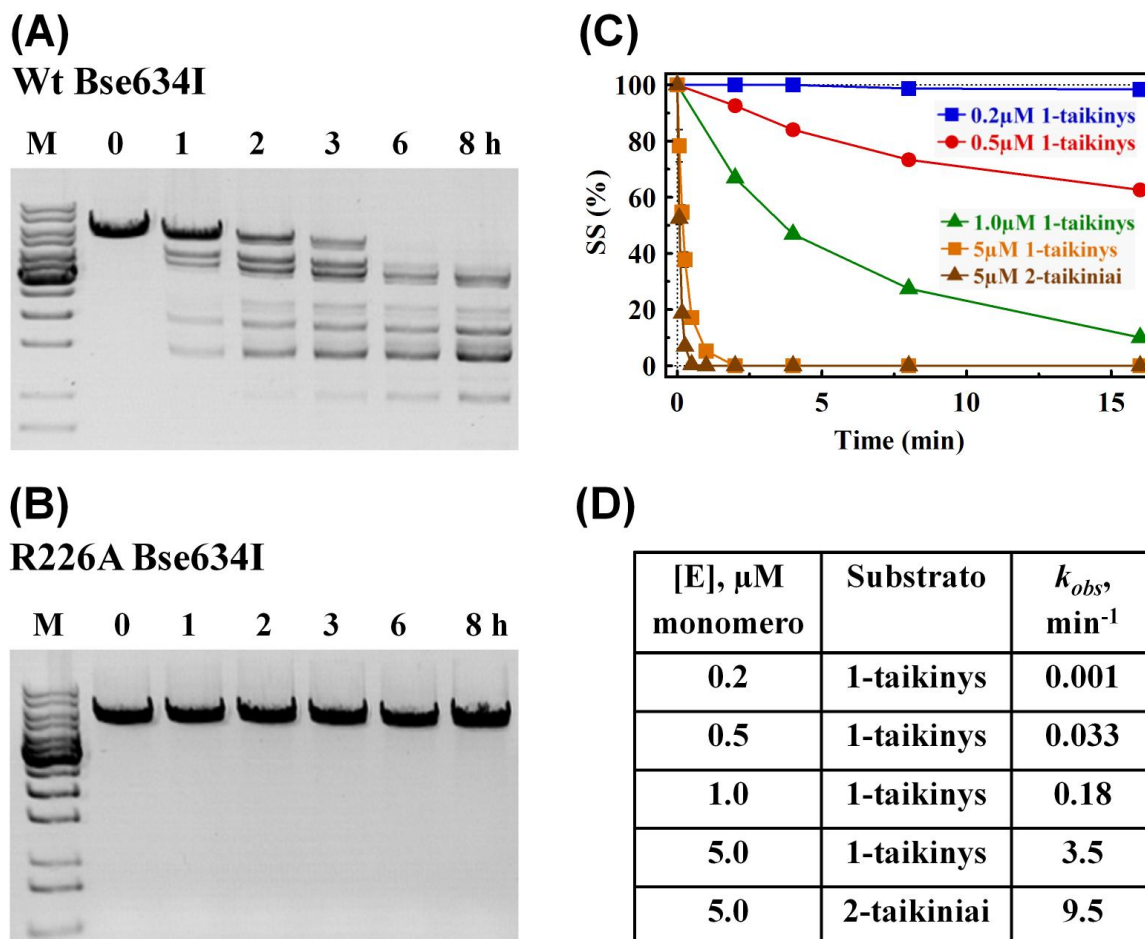
3.2. Nukreipiamos REazės su pablogintu dimerizacijos paviršiumi kūrimas

Tikslinio DNR taikinio hidrolizei su fotoreguliuojama REaze reikalinga preinkubacija stabiliam DNR tripleksui susidaryti. Per triplekso susidarymą blokuotas fermentas nukreipiamas prie tikslinio taikinio (15 paveikslas, „blokavimas“), tačiau, jeigu tirpale liktų laisvo REazės-TFO konjugato, tai po švitinimo su UV šviesa jis galėtų aktyvuotis ir hidrolizuoti kitus (netikslinius) taikinius. Šią problemą galima išspręsti kontroliuojant fermento oligomerizaciją. Yra pastebėta, kad kai kurių ortodoksinių REazių subvienetų sąveiką galima pabloginti mutacijų dėka (Fritsche ir Alves, 2004; Zaremba ir kiti, 2006). Pavyzdžiui, Bse634I dimerizacijos/tetramerizacijos paviršiaus mutacija R226A paverčia fermentą neaktyviu monomeru (Zaremba ir kiti, 2006), kuris gali dimerizuotis į aktyvų dimerą esant aukštesnei jo koncentracijai. Dviejų tokių monomerų sujungimas su skirtingais TFO nuvestų du monomerus arti vienas kito prie to paties Bse634I atpažinimo taikinio ir skatintų susijungti į kataliziškai aktyvų dimerą. Priešingai FokI junginiams, kurie DNR hidrolizei vykdyti naudoja nespecifinį nukleazinį domeną, ortodoksinės REazės monomeras turi ne tik katalizinę, bet ir DNR atpažinimo savybę. Susilpninta fermento dimerizacija turėtų apsaugoti nuo netikslinių DNR taikinių hidrolizės esant žemai fermento koncentracijai, tačiau tikslinio taikinio hidrolizė įsijungtų tuomet, kai du monomero-TFO konjugatai būtų nuvesti prie to paties taikinio pasinaudojant TFO-TFS sąveika (15 paveikslas, „kontroliuojama dimerizacija“).

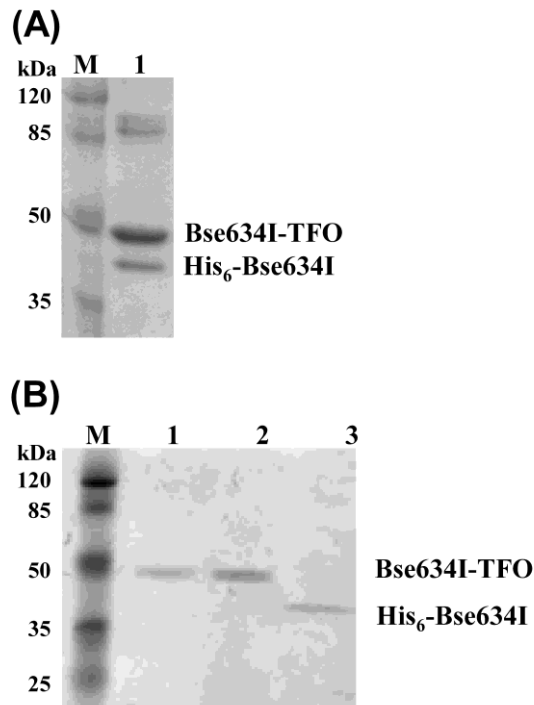
3.2.1. Bse634I-TFO konjugato konstravimas

Nukreipiamos REazės su susilpnintu dimerizacijos paviršiumi konstravimui buvo pasirinkta Bse634I REazė. Wt Bse634I yra stabilus homotetrameras, atpažįstantis DNR seką 5'-R/CCGGY-3' (kur R yra A/G ir Y yra T/C) ir hidrolizuojantis ją po pirmojo nukleotido (hidrolizės vieta parodyta "/"). Wt fermento keturi subvienetai susirenka į dimerą, sudarytą iš dviejų pirminių dimerų, kurie susijungę „nugaromis“, o DNR surišimo plyšiai yra priešingose pusėse (Grazulis ir kiti, 2002). Optimaliam fermento aktyvumui reikalinga prisijungti du DNR atpažinimo taikinius, o prisijungus vieną taikinį REazės aktyvumas smarkiai sulėtėjęs (Zaremba ir kiti, 2005). Buvo parodyta, kad arginino 226, esančio dimeras-dimeras paviršiuje, pakeitimas į alaniną paverčia Bse634I monomeru (Zaremba ir kiti, 2006). Sąveikos su DNR tyrimas parodė, kad R226A mutantas išsaugojo gebėjimą dimerizuotis ant specifinės DNR, tačiau esant aukštai

fermento koncentracijai (Zaremba ir kiti, 2006). DNR hidrolizės eksperimentai parodė netiesinę fermento aktyvumo priklausomybę nuo jo koncentracijos. Priešingai nei wt Bse634I atveju, kuris esant ir žemai koncentracijai greitai hidrolizuoja DNR (19A paveikslas), mutantas yra beveik neaktyvus esant 200 nM koncentracijai (DNR viengrandinio trūkio įvedimo greitis $\sim 0.1 \text{ h}^{-1}$, jokio dvigrandininio trūkio per 8 h), bet turi pastebimą aktyvumą esant 500 nM koncentracijai ir pilną katalizinę aktyvumą esant 5000 nM koncentracijai (dvigrandininės DNR hidrolizės greitis $\sim 4 \text{ min}^{-1}$). Be to, priešingai wt Bse634I, R226A yra pilnai aktyvus su DNR, turinčia vieną atpažinimo taikinį (19B-D paveikslai).



19 paveikslas. Wt Bse634I ir monomerinio mutanto R226A katalizinis aktyvumas. (A-B) Linijinio 5,5 kbp DNR substrato, turinčios septynis Bse634I taikinius, hidrolizė su wt ir R226A Bse634I. 50 nM DNR buvo sumaišyta su 200 nM wt Bse634I (A) ar su 200 nM monomeriniu mutantu R226A (B) 0-8 val. esant 37 °C temperatūrai buferyje: 80 mM Tris-fosfato (pH 6.1 esant 37 °C), 2 mM spermino, 2 mM MgCl_2 ir 10 mM DTT. Reakcijos buvo stabdomos su Stop tirpalu II ir analizuojamos elektroforezės agarozės gelyje būdu. (C-D) DNR hidrolizė esant įvairioms monomerinio Bse634I R226A mutanto koncentracijoms. Reakcijos buvo vykdomos Reakcijos buferyje II esant 25 °C temperatūrai su superspiralizuotais plazmidiniais substratais pUCAT1 ir pUCAT2, turinčiais vieną ar du 5'-ACCGGT-3' atpažinimo taikinius. Reakcijų paleidimas, stabdymas bei gautų rezultatų analizė buvo atlikta pagal Zaremba ir kolegos (Zaremba ir kiti, 2005). Substratinės DNR hidrolizės profiliai pavaizduoti (C), nustatytos hidrolizės greičio konstantos (D).



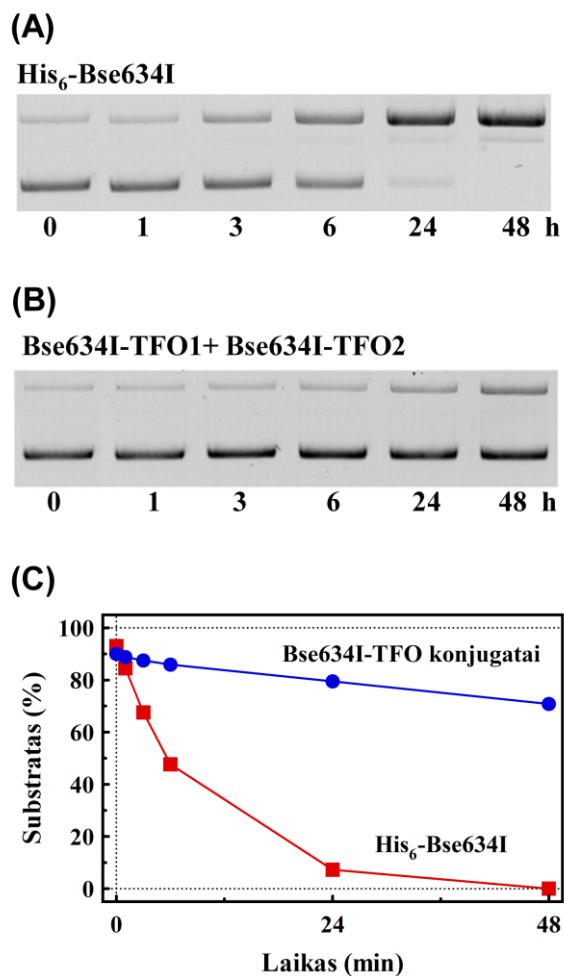
20 paveikslas. Bse634I-TFO konjugato konstravimas. (A) NDS forezė su His₆-Bse634I po TFO prijungimo reakcijos. (B) NDS forezė su išgrynintu Bse634I-TFO konjugatu. 1 ir 2 yra 1 ir 2 μl išgryninto Bse634I-TFO konjugato, 3 yra 50 ng His₆-Bse634I.

Wt Bse634I monomeras turi dvi cisteino a.r. pozicijose 10 ir 186. Kad netrukdytų TFO prijungimui šie cisteinai buvo pakeisti į serinus (C10S ir C186S mutacijos), o baltymo C-gale įstatyta His₆Gly₄Cys seka, turinti unikalų cisteiną. Sukonstruotas His₆ Bse634I R226A+C10S+C186S mutantas (His₆-Bse634I) pasižymi tokiomis pačiomis katalizinėmis savybėmis kaip ir Bse634I R226A. Bse634I-TFO konjugatai buvo konstruojami naudojant du 15 nt TFO (TFO1 ir TFO2), turinčius 5-metil-2'-deoksicitidino ir 5-[1-propynyl]-2'-deoksiuridino modifikacijas, kurios padidina DNR triplekso stabilumą esant neutraliam pH. Panašiai kaip ir MunI atveju, TFO'ai buvo prijungti prie baltymo C-galinio cisteino per bifunkcinį agentą GMBS. Susidaręs Bse634I-TFO konjugatas buvo išgrynintas nuo nesureagavusio baltymo bei TFO panaudojant jonų mainų chromatografiją (20B paveikslas).

3.2.2. Bse634I-TFO konjugato aktyvumas ir specifiškumas

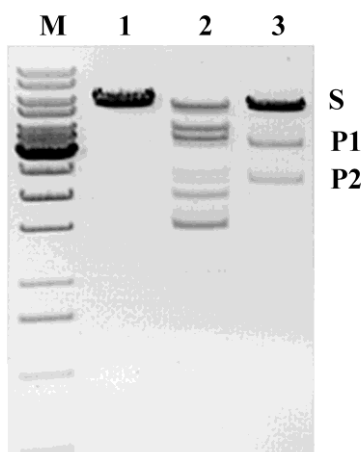
Pirmiausiai buvo palygintas His₆-Bse634I ir Bse634I-TFO konjugatų aktyvumas su superspiralizuotu plazmidiniu substratu pUCAT1 (Zaremba ir kiti, 2005), turinčiu vieną Bse634I atpažinimo taikinį ir jokių TFS. Gauta, kad TFO prijungimas prie Bse634I C-galo apie 20 kartų sulėtina DNR viengrandinio trūkio įvedimą (iki ~0.005 h⁻¹ su 200 nM Bse634I-TFO konjugatų, 21 paveikslas). Tai galėtų būti paaiškinama neigiamų krūvių atostūmiu tarp nekomplementarių TFO ir DNR. Norint iširti Bse634I-TFO konjugatų gebėjimą specifiškai atpažinti ir hidrolizuoti tikslinį DNR taikinį buvo panaudota 5.5 kbp linijinė DNR, turinti septynis Bse634I atpažinimo taikinius. Vienas iš šių taikinių buvo apsuptas dviem skirtingomis 15 bp polypyrimidinėmis sekomis (23A paveikslas), kurios sudaro DNR tripleksus su TFO1 ir TFO2. Kontrolinis eksperimentas

su 2 μM His₆-Bse634I parodė, kad šis fermentas, be prijungtų TFO, nedemonstruoja pirmumo tiksliniam taikiniui (22 paveikslas).

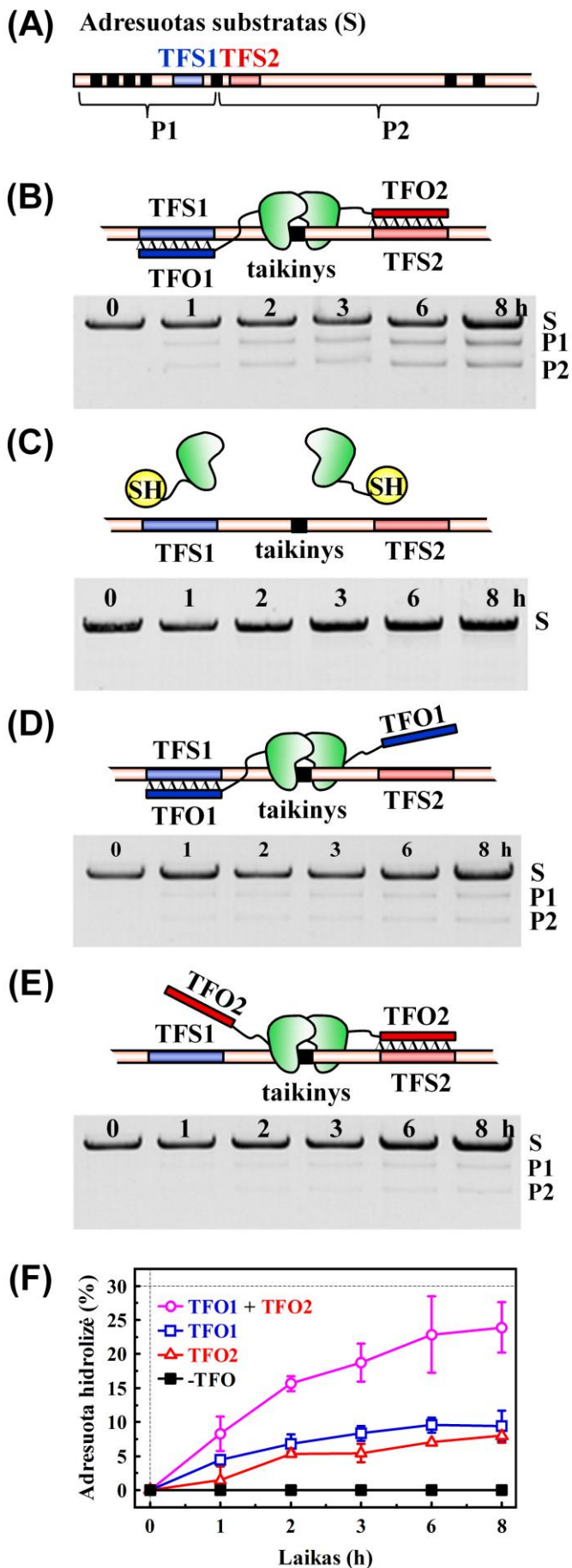


21 paveikslas. His₆-Bse634I ir Bse634I-TFO konjugatų aktyvumas su vieną atpažinimo taikinį turinčia pUCAT1 plazmide.

(A) Superspiralizuotos pUCAT1 plazmidės hidrolizė su His₆-Bse634I. 50 nM plazmidinės DNR buvo sumaišyta su 200 nM His₆-Bse634I monomero Reakcijos buferyje III, esant 37 °C temperatūrai. Reakcija buvo stabdoma su Stop tirpalu II ir analizuota elektroforezės akarozės gelyje būdu. (B) 50 nM superspiralizuotos pUCAT1 plazmidės hidrolizė su 200 mM Bse634I-TFO1 ir Bse634I-TFO2 konjugatų mišiniu Reakcijos buferyje III, esant 37 °C temperatūrai. Pavyzdžiai buvo analizuoti taip kaip ir (A). (C) Superspiralizuotos DNR hidrolizė su His₆-Bse634I (raudoni kvadratai) ir su Bse634I-TFO konjugatais (mėlyni apskritimai). Duomenys buvo aprašyti vienksoponentinėmis funkcijomis, o nustatytos greičių konstantos buvo 0.11 h⁻¹ su His₆-Bse634I ir 0.005 h⁻¹ su Bse634I-TFO konjugatais.



22 paveikslas. DNR hidrolizė su His₆-Bse634I ir Bse634I-TFO konjugatais. 50 nM 5.5 kbp linijinės DNR, turinčios vieną tikslinį ir šešis kitus Bse634I taikinius, buvo inkubuota su 200 nM monomeriniu His₆-Bse634I (2 eilutė) arba su 200 nM His₆-Bse634I-TFO1 ir Bse634I-TFO2 konjugatais (3 eilutė) Triplekso buferyje II, esant 37 °C temperatūrai. 1 eilutė nehidrolizuotas substratas, M eilutė yra "GeneRuler 1 kbp DNA Ladder" (Fermentas UAB).



23 paveikslas. Tikslinio DNR taikinio hidrolizė su Bse634I-TFO konjugatais. 5.5 kbp linijinis DNR substratas, turintis vieną tikslinį taikinį (su tripleksą formuojančiomis sekomis TFS1 (mėlyna) ir TFS2 (raudona), nutolusiomis per 9 bp nuo Bse634I taikinio) ir šešis kitus taikinius (A) buvo inkubuotas su ekvimoliariniu Bse634I-TFO1 ir Bse634I-TFO2 konjugatų kiekiu, esant 37 °C temperatūrai (B). Tik tikslinio DNR taikinio hidrolizės produktai (2298 bp ir 3257 bp fragmentai P1 ir P2) susidarė per 1-8 val. inkubaciją. Kontroliniai eksperimentai atlikti su His₆-Bse634I, neturinčiu prijungto TFO (C), ir atskirais Bse634I-TFO1 ir Bse634I-TFO2 konjugatais (D-E). Skirtingų eksperimentų DNR hidrolizė pavaizduota grafike (F). Rezultatų taškai yra vidurkis iš 3 (TFO1+TFO2) ar 2 (TFO1, TFO2) nepriklausomų pakartojimų su ± 1 standartine paklaida.

Inkubavus ekvimoliarinį 200 nM Bse634I-TFO1 ir Bse634I-TFO2 konjugatų kiekį su 50 nM 5.5 kbp linijinio DNR substrato Triplekso buferyje II buvo stebimas 3257 ir 2298 bp DNR fragmentų atsiradimas, kuris atitinka tikslinio taikinio hidrolizę (23B paveikslas). Per 8 val. buvo hidrolizuota apie 25% substrato, o kitų taikinių hidrolizės stebima nebuvo (23F paveikslas). Atsižvelgiant į tai, kad 5.5 kbp substratas turi 6 kartus daugiau kitų Bse634I taikinių nei tikslinių ir į su etidžio bromidu dažytos DNR detekcijos ribą (~10 ng arba ~1% visos DNR, esančios agarozės gelio), galima teigti, kad tikslinio ir netikslinio Bse634I taikinio hidrolizės greitis skiriasi mažiausiai 100 kartų.

Tam, kad parodytume jog tikslinį taikinį turinčios DNR hidrolizei reikalingos abi TFO1-TFS1 ir TFO2-TFS2 sąveikos mes atlikome kontrolinius eksperimentus naudodami (i) His₆-Bse634I be prijungtų TFO, (ii) tik Bse634I-TFO1 konjugatą ir (iii) tik Bse634I-TFO2 konjugatą. Eksperimento su His₆-Bse634I, kuris neturi prijungto TFO, metu per 8 val. inkubacijos DNR neatsirado jokie dvigrandininio trūkio (23C paveikslas). Šis tyrimas patvirtina, kad TFO-TFS sąveika yra būtina tam, kad du Bse634I monomerai susijungtų į aktyvų dimerą ant DNR. Atskiri Bse634I-TFO konjugatai įvykdė tikslinio DNR taikinio hidrolizę (23D ir E paveikslas), tačiau reakcijos greitis buvo 2.5 karto (Bse634I-TFO1) ir 3 kartus (Bse634I-TFO2) lėtesnis nei naudojant abiejų konjugatų mišinį (23C paveikslas). Tai parodo, kad mūsų reakcijos sąlygomis (200 nM Bse634I-TFO konjugatų) kataliziškai aktyvus Bse634I dimeras prie tikslinio DNR taikinio susirenka dviem būdais. Optimaliu atveju abu Bse634I monomerai nukeliauja prie tikslinio DNR taikinio per TFO-TFS sąveiką, dėl to gaunamas žymiai didesnė hidrolizuotos DNR išeiga. Kitu atveju vienas Bse634I monomeras prisijungia šalia taikinio per triplekso susidarymą, o antras laisvas monomeras paimamas iš tirpalo.

IŠVADOS

1. Nustatytas restrikcijos endonukleazės MunI dimero subvienetų apsikeitimo greitis bei surastos sąlygos, kurioms esant, MunI dimeras yra stabilus ir subvienetų apsikeitimas nevyksta.
2. Ištirtas restrikcijos endonukleazės MunI denatūracijos GdmCl reakcijos kelias. MunI denatūracija veikiant GdmCl vyksta dviem atskirais etapais: pirmiausiai MunI dimeras disocijuoja į monomerus ir tik po to įvyksta monomero išsivyniojimas.
3. MunI dimerizacijos paviršiuje įvestas disulfidinis ryšys veikia kaip „oks-red“ jungiklis, kuris kontroliuoja DNR hidrolizės aktyvumą. Disulfidinį ryšį turinti MunI forma yra visiškai neaktyvi, tačiau redukuojančios medžiagos pridėjimas pilnai atstato fermento katalizinį aktyvumą.
4. MunI dimerizacijos paviršiuje įvestas fotochemiškai aktyvus junginys suardo MunI dimerą į neaktyvius monomerus. Švitinimas su UV šviesa pašalina cheminį junginį ir atstato MunI katalizinį aktyvumą.
5. Sukonstruoti kontroliuojamo katalizinio aktyvumo restrikcijos endonukleazės Bse634I-TFO konjugatai, skirti kryptingai DNR hidrolizei.
6. Restrikcijos endonukleazės-TFO konjugatai atveria galimybes naujų įrankių, tinkančių genų terapijai, konstravime.

MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. **Silanskas, A.**, Zaremba, M., Sasnauskas, G., Siksnyš, V. (2012) Catalytic activity control of restriction endonuclease--triplex forming oligonucleotide conjugates. *Bioconjug Chem* **23**(2): 203-211.
2. **Silanskas, A.**, Foss, M., Wende, W., Urbanke, C., Lagunavicius, A., Pingoud, A., Siksnyš, V. (2011) Photocaged variants of the MunI and PvuII restriction enzymes. *Biochemistry* **50**(14): 2800-2807.

Kita publikacija:

3. Geel, T.M., Meiss, G., van der Gun, B.T., Kroesen, B.J., de Leij, L.F., Zaremba, M., **Silanskas, A.**, Kokkinidis, M., Pingoud, A., Ruiters, M.H., McLaughlin, P.M., Rots, M.G. (2009) Endonucleases induced TRAIL-insensitive apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res* **315**: 2487-2495.

Patentinė paraiška:

4. Siksnyš, V., Zaremba, M., Sasnauskas, G., **Silanskas, A.** (2011) Generation of restriction endonuclease triplex forming oligonucleotide conjugates with switchable activity. USA provisional patent application Nr.: 61/522,310.

Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **Silanskas, A.**, Urbanke, C., Siksnyš, V. Type II restriction endonuclease under light control. 6th New England Biolabs Meeting on Restriction/Modification, Jacobs University, Bremen, Germany; 2010.08.01-06.
2. **Silanskas, A.**, Lagunavicius, A., Urbanke, C., Siksnyš, V. Reversible redox switch at the dimer interface of MunI restriction enzyme. 5th New England Biolabs Meeting on Restriction/Modification; University of Bristol, Bristol, UK, 2004.09.04-08.

FINANSINĖ PARAMA

Disertacijoje aprašyti darbai buvo finansuoti Europos sąjungos FP5 (EnGem projektas) ir Europos sąjungos FP6 (MenuG projektas) programos lėšomis.

CURRICULUM VITAE

Vardas, Pavardė	Arūnas Šilanskas
Gimimo data	1977 12 05
Darbo adresas	Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius Vilniaus universitetas Biotechnologijos institutas V.A. Graičiūno 8 Vilnius LT-02241
Telefonai	+370 5 2602111 (darbo) +370 600 09405 (asmeninis)
Faksas	+370 5 2602116 (darbo)
E-paštas	shilas@ibt.lt
Išsilavinimas	
1996-2000	Biochemijos bakalauras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
2000-2002	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
Darbo patirtis	Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius
2003-2005	Laborantas
2005-2006	Bioinžinierius
2006-dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas

PADĖKA

Esu labai dėkingas savo darbo vadovui prof. dr. Virginijui Šikšniui už vadovavimą šiam darbui, diskusijas ir vertingus pasiūlymus, pagalbą ruošiant šią disertaciją bei įvairių laisvalaikio renginių organizavimą.

Dėkoju savo bakalaurinio bei magistrinio darbo vadovui dr. Arūnui Lagunavičiui („Thermo Fisher Scientific“) už pirmuosius darbo įgūdžius, R.MunI ir M.MunI ekspresijos plazmides bei pirmąjį denatūruojamo MunI fluorescencijos matavimą.

Esu labai dėkingas visiems mano kolegoms iš Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriaus, ypač: dr. Mindaugui Zarembai už diskusijas, pagalbą planuojant eksperimentus bei ruošiant publikaciją, taip pat už Bse634I ekspresijos plazmidę bei DNR hidrolizės eksperimentus su Bse634I R226A mutantu; dr. Giedriui Sasnauskui už konsultacijas kinetikos eksperimentuose bei pagalbą ruošiant publikaciją; dr. Giedrei Tamulaitienei už pagalbą ruošiant šią disertaciją.

Dėkoju prof. dr. Claus Urbanke (Hanoverio Aukštoji Medicinos Mokykla) už analitinio ultracentrifugavimo eksperimentus. Taip pat esu labai dėkingas prof. dr. Alfred Pingoud, dr. Wolfgang Wende ir dr. Kristin Eisenschmidt (Gyseno Justus-Liebig Universitetas) už pagalbą atliekant CD matavimus bei pirmus MunI ir TFO sujungimo eksperimentus.

Esu dėkingas savo chemijos mokytojai Genovaitei Banevičienei už tai, kad sudomino chemijos mokslu, dėl to pasukau į biochemijos sritį.

Dėkoju visiems savo draugams už paramą ir pagalbą, ypatingai dr. Rūtai Gerasimaitei ir Ramintai Kairytei už disertacijos ir jos santraukos teksto gramatikos taisymą, dr. Gražvydui Lukinavičiui ir dr. Mantui Mališauskui už pastovų raginimą stengtis greičiau apsiginti disertaciją.

Labai dėkoju visiems savo šeimos nariams, ypač žmonai Marijai už paramą ir supratimą, bei vaikams Ugnei ir Ignui už šypsenas ir juoką.

SUMMARY

The human genome contains approximately 20,000-25,000 different protein-coding genes (Collins et al, 2004). Simple mutations within the coding region of critical genes can lead to the formation of abnormal proteins, resulting in various diseases (e.g. cancer), in failure of an embryo to develop, or premature death. One of the most promising strategies for gene correction is based on homologous recombination, wherein the DNA sequence needed to correct the gene of interest is supplied *in trans* to stimulate site-specific recombination. Homologous recombination is the ultimate tool for gene replacement, but is limited by low efficiency and reproducibility. However, it is known that DNA double-strand breaks enhance the efficiency of homologous recombination by several orders of magnitude (up to 10,000-fold). However, for *in vivo* applications absolute site-specificity is required. Therefore, gene therapy *via* homologous recombination requires new molecular tools that should be highly specific and rigorously controllable.

In this work we have focused on the development of highly specific and rigorously controllable meganucleases using restriction enzyme-triple helix forming oligonucleotide (TFO) conjugates. In the restriction endonuclease (REase)-TFO conjugates TFO provides specificity for the extended recognition site through the triple helix formation (Fox, 2000) and addresses RE to a particular target site where it introduces a double stranded break. A proof of principle for the development of restriction enzyme-TFO conjugates has been provided before using engineered single-chain PvuII variant (Eisenschmidt et al, 2005). To explore the possibility to extend the repertoire of available RE's we used REases MunI and Bse634I, which were structurally and biochemically characterized before in our laboratory (Deibert et al, 1999; Grazulis et al, 2002; Sasnauskas et al, 1999; Stakenas et al, 1992; Zarembo et al, 2005; Zarembo et al, 2006).

In the present study we provide proof-of-concept demonstrations of two alternative strategies to control the DNA cleavage activity of restriction endonuclease-TFO conjugates. In the first approach we successfully combined the restriction endonuclease photocaging and TFO-coupling to generate a photoswitchable MunI-TFO conjugate. The caged MunI-TFO conjugate has two important advantages in comparison to the scPvuII-TFO conjugate described in the study by Eisenschmidt and colleagues (Eisenschmidt et al, 2005). First, the preincubation of caged REase-TFO conjugate with target DNA can be performed in any buffer that is compatible with triple helix formation. In particular, the reaction buffer may contain Mg^{2+} ions present in cellular milieu that would otherwise induce DNA binding and cleavage of unaddressed sites by the restriction endonuclease module of the REase-TFO conjugate. Second, it employs the native homodimeric form of an orthodox restriction endonuclease MunI. Given the wide choice of structurally characterized homodimeric REases, TFO-coupling combined with photocaging of essential functional regions of homodimeric REases (e.g., dimerization interface or DNA binding surface) has the potential of becoming a general approach to targeted DNA cleavage. The alternative strategy presented here makes use of attenuated dimerization of the monomeric mutant of restriction endonuclease Bse634I. Two nuclease monomers dimerize and cut DNA only when are brought into close proximity by the site-specific

interactions of the DNA binding modules (TFO). Triggering of DNA cleavage activity by Bse634I upon triple helix formation should enable addressed DNA cleavage without a separate preincubation step given the reaction buffer is compatible with triplex formation and DNA cleavage.

LITERATŪROS SARAŠAS

1. Arnould S, Chames P, Perez C, Lacroix E, Duclert A, Epinat JC, Stricher F, Petit AS, Patin A, Guillier S, Rolland S, Prieto J, Blanco FJ, Bravo J, Montoya G, Serrano L, Duchateau P, Paques F (2006) Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *J Mol Biol* **355**: 443-458
2. Barry JK, Matthews KS (1999) Thermodynamic analysis of unfolding and dissociation in lactose repressor protein. *Biochemistry* **38**: 6520-6528
3. Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D (2006) Efficient gene targeting in Drosophila with zinc-finger nucleases. *Genetics* **172**: 2391-2403
4. Bibikova M, Golic M, Golic KG, Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in Drosophila using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**: 1169-1175
5. Christian M, Cermak T, Doyle EL, Schmidt C, Zhang F, Hummel A, Bogdanove AJ, Voytas DF (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**: 757-761
6. Collins FS, Lander ES, Rogers J, Waterson RH (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931-945
7. Deibert M, Grazulis S, Janulaitis A, Siksnys V, Huber R (1999) Crystal structure of MunI restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.7 Å resolution. *Embo J* **18**: 5805-5816
8. Dupureur CM, Dominguez MA, Jr. (2001) The PD...(D/E)XK motif in restriction enzymes: a link between function and conformation. *Biochemistry* **40**: 387-394
9. Eisenschmidt K, Lanio T, Simoncsits A, Jeltsch A, Pingoud V, Wende W, Pingoud A (2005) Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* **33**: 7039-7047
10. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**: 70-77
11. Fox KR (2000) Targeting DNA with triplexes. *Curr Med Chem* **7**: 17-37

12. Fritsche P, Alves J (2004) A monomeric mutant of restriction endonuclease EcoRI nicks DNA without sequence specificity. *Biol Chem* **385**: 975-985
13. Grazulis S, Deibert M, Rimseliene R, Skirgaila R, Sasnauskas G, Lagunavicius A, Repin V, Urbanke C, Huber R, Siksnys V (2002) Crystal structure of the Bse634I restriction endonuclease: comparison of two enzymes recognizing the same DNA sequence. *Nucleic Acids Res* **30**: 876-885
14. Grizot S, Epinat JC, Thomas S, Duclert A, Rolland S, Paques F, Duchateau P (2010) Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds. *Nucleic Acids Res* **38**: 2006-2018
15. Haq I, O'Brien R, Lagunavicius A, Siksnys V, Ladbury JE (2001) Specific DNA recognition by the type II restriction endonuclease MunI: the effect of pH. *Biochemistry* **40**: 14960-14967
16. Kim YG, Cha J, Chandrasegaran S (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1156-1160
17. Lagunavicius A, Grazulis S, Balciunaite E, Vainius D, Siksnys V (1997) DNA binding specificity of MunI restriction endonuclease is controlled by pH and calcium ions: involvement of active site carboxylate residues. *Biochemistry* **36**: 11093-11099
18. Li T, Huang S, Zhao X, Wright DA, Carpenter S, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2011) Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **39**: 6315-6325
19. Merickel SK, Sanders ER, Vazquez-Ibar JL, Johnson RC (2002) Subunit exchange and the role of dimer flexibility in DNA binding by the Fis protein. *Biochemistry* **41**: 5788-5798
20. Miller DL, Schildbach JF (2003) Evidence for a monomeric intermediate in the reversible unfolding of F factor TraM. *J Biol Chem* **278**: 10400-10407
21. Miller JC, Holmes MC, Wang J, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ (2007) An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* **25**: 778-785
22. Paques F, Duchateau P (2007) Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* **7**: 49-66

23. Park SY, Quezada CM, Bilwes AM, Crane BR (2004) Subunit exchange by CheA histidine kinases from the mesophile *Escherichia coli* and the thermophile *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **43**: 2228-2240
24. Repin VE, Lebedev LR, Puchkova L, Serov GD, Tereschenko T, Chizikov VE, Andreeva I (1995) New restriction endonucleases from thermophilic soil bacteria. *Gene* **157**: 321-322
25. Sambrook J, Fritsch, E.F., ir Maniatis, T. (ed) (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
26. Sasnauskas G, Jeltsch A, Pingoud A, Siksnyš V (1999) Plasmid DNA cleavage by MunI restriction enzyme: single-turnover and steady-state kinetic analysis. *Biochemistry* **38**: 4028-4036
27. Schneider F, Hammarstrom P, Kelly JW (2001) Transthyretin slowly exchanges subunits under physiological conditions: A convenient chromatographic method to study subunit exchange in oligomeric proteins. *Protein Sci* **10**: 1606-1613
28. Siksnyš V, Pleckaityte M (1992) Role of the reactive cysteine residue in restriction endonuclease Cfr9I. *Biochim Biophys Acta* **1160**: 199-205
29. Siksnyš V, Zareckaja N, Vaisvila R, Timinskas A, Stakenas P, Butkus V, Janulaitis A (1994) CAATTG-specific restriction-modification munI genes from *Mycoplasma*: sequence similarities between R.MunI and R.EcoRI. *Gene* **142**: 1-8
30. Sobott F, Benesch JL, Vierling E, Robinson CV (2002) Subunit exchange of multimeric protein complexes. Real-time monitoring of subunit exchange between small heat shock proteins by using electrospray mass spectrometry. *J Biol Chem* **277**: 38921-38929
31. Stahl F, Wende W, Jeltsch A, Pingoud A (1996) Introduction of asymmetry in the naturally symmetric restriction endonuclease EcoRV to investigate intersubunit communication in the homodimeric protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6175-6180
32. Stakenas PS, Zaretskaia NM, Manelene ZP, Mauritsas MM, Butkus VV, Janulaitis AA (1992) [*Mycoplasma* restriction-modification system MunI and its possible role in pathogenesis processes]. *Mol Biol (Mosk)* **26**: 546-557

33. Zaremba M, Sasnauskas G, Urbanke C, Siksnys V (2005) Conversion of the tetrameric restriction endonuclease Bse634I into a dimer: oligomeric structure-stability-function correlations. *J Mol Biol* **348**: 459-478
34. Zaremba M, Sasnauskas G, Urbanke C, Siksnys V (2006) Allosteric communication network in the tetrameric restriction endonuclease Bse634I. *J Mol Biol* **336**: 81-92
35. Zaremba M, Urbanke C, Halford SE, Siksnys V (2004) Generation of the BfiI restriction endonuclease from the fusion of a DNA recognition domain to a non-specific nuclease from the phospholipase D superfamily. *J Mol Biol* **336**: 81-92