

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**Georgij Kostiuk**

**Monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI-DNR sąveikos  
tyrimas pavienių molekulių metodais**

Daktaro disertacijos santrauka

Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

**Vilnius, 2017**

Disertacija rengta 2010-2014 m. Vilniaus universiteto Biotechnologijos institute studijuojant doktorantūroje ir ginama eksternu.

Mokslinis vadovas – prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P). Nuo 2010 m. spalio 1 d. iki 2014 m. rugsėjo 30 d.

Mokslinis konsultantas – dr. **Giedrius Sasnauskas** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P).

### **Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje:**

**Pirmininkė** – prof. dr. **Edita Sužiedelienė** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P).

#### **Nariai:**

Prof. dr. **Giedrius Vilkaitis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P),

Prof. dr. **Jaunius Urbonavičius** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P),

Dr. **Danielis Rutkauskas** (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, fizika – 02 P),

Dr. **Gražvydas Lukinavičius** (Max Planck biofizikinės chemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija - 04 P).

Disertacija bus ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2017 m. liepos 4 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro 401R auditorijoje.

Adresas: Sauletekio al. 7, LT – 10257, Vilnius, Lithuania.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2017 m. birželio 2 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto internetiniame puslapyje:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

**VILNIUS UNIVERSITY**

**Georgij Kostiuk**

**Single molecule studies of the monomeric restriction  
endonuclease BcnI-DNA interactions**

Summary of doctoral dissertation

Physical sciences, biochemistry (04 P)

**Vilnius, 2017**

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Vilnius University during 2010-2014.

**Supervisor:**

Prof. dr. **Virginijus Šikšnys** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P). From 2010 october 1<sup>st</sup> till 2014 september 30<sup>th</sup>.

**Scientific advisors:**

Dr. **Giedrius Sasnauskas** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

**Evaluation board of dissertation of Biochemistry trend**

**Chairman:**

Prof. dr. **Edita Sužiedalienė** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

**Members:**

Prof. dr. **Giedrius Vilkaitis** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Prof. dr. **Jaunius Urbonavičius** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry - 04 P)

Dr. **Danielis Rutkauskas** (Center for physical sciences and technology, physics - 02 P)

Dr. **Gražvydas Lukinavičius** (Max Planck Institute of biophysical chemistry , physical sciences, biochemistry - 04 P)

The thesis defence will take place at the Vilnius university, Life Sciences Center, R401 (Sauletekio av. 7, LT – 10257, Vilnius, Lithuania) on 4<sup>th</sup> of July, 2017, at 10:00 a.m.

The summary of doctoral dissertation was sent on 2<sup>nd</sup> of June, 2017.

The thesis is available at the Library of Vilnius University and at the VU internet.

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)

# TURINYS

<b>TURINYS</b> .....	<b>5</b>
<b>SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>7</b>
<b>TYRIMŲ METODIKA</b> .....	<b>10</b>
<b>REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	<b>19</b>
<b>1. Monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmas.</b> .....	<b>19</b>
1.1. „Vienos apskukos” BcnI reakcijos ant superspiralizuoto DNR substrato. ..	20
1.2. „Vienos apskukos” BcnI reakcijos ant viengrandininį trūkį turinčių oligodupleksų .....	22
1.3. BcnI „stacionariosios” reakcijos su superspiralizuotu DNR substratu .....	23
1.4. Eksperimentai su DNR ir baltymo „gaudyklėmis” .....	24
1.5. Monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmas .....	26
<b>2. Pavienių molekulių eksperimentai</b> .....	<b>28</b>
2.1. Apo-BcnI ir BcnI-DNR kompleksų struktūrų palyginimas. ....	28
2.2. BcnI žymėjimo pozicijų nustatymas. ....	29
2.3. BcnI cisteininių mutantų konstravimas, gryninimas ir charakterizavimas. ....	29
2.4. BcnI žymėjimas fluorescentiniais dažais. ....	30
2.5. Fiorsterio spinduolio nustatymas. ....	31
2.6. BcnI konformacinės būsenos. ....	32
2.7. BcnI-nespecifinės DNR sąveikos dinamika .....	34
2.7.1. Pavienių BcnI molekulių vienmatė difuzija ir „šokčiojimai” ant DNR. ....	34
2.7.2. BcnI procesyvumo eksperimentai .....	39
2.8. BcnI-DNR specifinė sąveika .....	41
2.8.1. Vyraujanti BcnI orientacija sąveikaujant su specifine DNR. ....	41
2.8.2. BcnI ir specifinės DNR pavienių molekulių sąveikos dinamika. ....	43
2.8.3. BcnI specifinio taikinio antrosios DNR grandinės hidrolizės pavienių molekulių eksperimentai .....	44
<b>IŠVADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS</b> .....	<b>47</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>48</b>
<b>PADĖKA</b> .....	<b>49</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>50</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	<b>52</b>

## SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

2-ME	2-merkaptoetanolis
JSA	jaučio serumo albuminas
DTT	ditiotreitolis
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
EMCCD	angl. electron-multiplying charge-coupled camera
EMSA	elektroforetinio judrumo poslinko metodas (angl. electrophoretic mobility shift assay)
FRET	Fiorsterio rezonansinės energijos pernaša (angl. Förster resonance energy transfer)
MSD	vidutinis kvadratinis pasiskirstymas (angl. mean-squared displacement)
NDS	natrio dodecilsulfatas
PEG	polietilenglikolis
R - M	restrikcijos - modifikacijos sistema
REazė	restrikcijos endonukleazė
S	C arba G nukleotidas
TIRF	visiško vidinio atspindžio fluorescencija (angl. total internal reflection fluorescence)
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
TCEP	tris(2-karboksietil)fosfinas
TROLOX	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-karboksirūgštis

# IVADAS

Gyvybiškai svarbūs ląstelės procesai, tokie kaip DNR replikacija, DNR reparacija, genų raiškos valdymas, rekombinacija ir antivirusinė apsauga, yra valdomi baltymų, sąveikaujančių su specifinėmis DNR sekomis. Viena iš svarbiausių biologijos ir biofizikos mokslų užduočių yra išsiaiškinti kaip baltymai sugeba atpažinti specifines DNR sekas tarp daugybės nespecifinių. Fermentai, kurie gali įvesti viengrandinį trūkį, modifikuoti DNR bazes ar hidrolizuoti DNR specifinės sekos fosfodiesterinį ryšį, privalo ne tik sudaryti specifinius kontaktus su DNR atpažinimo seka, bet ir įvykdyti cheminę reakciją.

II tipo restrikcijos endonukleazės (REazės) yra viena iš didžiausių baltymų grupių, specifiskai atpažįstančių DNR sekas. Šie fermentai atpažįsta trumpas (4-8 bp) DNR sekas ir hidrolizuoja abi DNR grandines šalia arba atpažinimo sekoje. REazės priklauso restrikcijos-modifikacijos (R - M) sistemoms, kurios apsaugo bakterijos ir archėjas nuo svetimos (pvz. bakteriofagų) DNR (Pingoud et al., 2014). Dėl paprasto veikimo (daugumos REazių aktyvumui reikalingi tik  $Mg^{2+}$  jonai), neeilinio specifiskumo ir efektyvumo, restrikcijos endonukleazės yra nepakeičiami įrankiai atliekant *in vitro* DNR manipuliacijas, bei tinkami modeliniai objektai specifinio taikinio suradimo, atpažinimo ir hidrolizės tyrimams. Restrikcijos endonukleazių tyrimai leido išsiaiškinti „palengvintosios“ difuzijos mechanizmą, t. y. baltymo specifinės sekos suradimo mechanizmą, „šliaužiojant“ ir „šokinėjant“ ant nespecifinės DNR. (Halford, 2004). Nors REazės atlieka vienodą funkciją – hidrolizuoja DNR specifinėse sekose – REazės yra nevienalytė ir labai skirtinga baltymų grupė, kurie tarpusavyje skiriasi oligomerine būsena, domenų organizacija, atpažinimo sekomis bei reakcijos mechanizmais. Pavyzdžiui, tipinės restrikcijos endonukleazės EcoRI (Kim et al., 1990) ir MunI (Deibert, 1999), yra simetriniai homodimerai, kurių kiekvienas monomeras sudaro specifinius kontaktus su palindrominės atpažinimo sekos kiekviena DNR grandine ir ją hidrolizuoja. Panašią specifinės DNR hidrolizės strategiją, kai hidrolizuojamųjų DNR grandinių kiekis atitinka katalitinių centrų kiekį, naudoja homotetramerinės IIF tipo restrikcijos endonukleazės, kurios vienu metu atpažįsta ir hidrolizuoja dvi simetrines atpažinimo sekas (Cfr10I (Siksnys et al., 1999), NgoMIV (Embleton et al., 2001), Bse634I (Zaremba et al., 2005), Cfr42I (Gasiunas et al., 2008)), ir kelios IIS tipo REazės, kurios atpažįsta asimetrines DNR sekas ir hidrolizuoja DNR vienoje atpažinimo sekos pusėje, yra monomerinės REazės Mva1269I (turinti du aktyvius centrus vienoje polipeptidinėje grandinėje (Armalyte et al., 2005)), ir FokI (atpažinusi specifinę DNR dimerizuojasi (Catto et al., 2008)).

Dalis REazių hidrolizuoja dvigrandinę DNR tik vienu aktyviuoju centru. IIS tipo homodimerinė REazė BfiI, turi vienintelį aktyvų centrą, išsidėsčiusį dviejų nukleazinių domenų paviršiuje, kuriuo iš eilės, keisdamas sąveikos orientaciją ant DNR, hidrolizuoja abi specifinio taikinio grandines. Visos dvigrandinės DNR hidrolizės reakcijos metu, BfiI atpažinimo domenai sąveikauja su specifine seka (Sasnauskas et al., 2010).

Tyrimo objektas - restrikcijos endonukleazė BcnI, taip pat yra monomerinė, specifiskai atpažįstanti ir hidrolizuojanti dvigrandinę DNR. Struktūriniai duomenys rodo, kad BcnI sudaro asimetrinį kompleksą su pseudopalindromine atpažinimo seka 5'-CC/SGG-3' (kur S yra C arba G, ir '/' žymi hidrolizės poziciją) dviem orientacijomis, kuriose išdėsto aktyvųjį centrą ties viena iš atpažinimo sekos grandinių (Sokolowska et al., 2007). Norėdami išsiaiškinti BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmą, mes pasitelkėme biocheminius ir biofizikinius metodus, tokius kaip kinetines reakcijas ir pavienių molekulių eksperimentus, leidžiančius išsiaiškinti BcnI specifinio DNR taikinio radimo ir hidrolizės mechanizmus.

### **Pagrindiniai darbo tikslai ir uždaviniai:**

- i nustatyti monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmą;
- ii naudojant pavienių molekulių tyrimo metodus, charakterizuoti BcnI specifinio taikinio suradimo procesus: BcnI konformacines būsenas, BcnI sąveikos su specifine ir nespecifine DNR dinamiką bei palengvintą difuziją.

### **Mokslinis naujumas.**

Pirmą kartą atlikta detali, monomerinės restrikcijos endonukleazės dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmo, kinetinė analizė;

Pirmą kartą atlikti tyrimai, skirti, su DNR sąveikaujančio baltymo specifinio taikinio paieškos mechanizmo nustatymui, naudojant tiek daug skirtingų pavienių molekulių tyrimo metodų: (i) FRET eksperimentai konfokaliniu mikroskopu (atlikti BcnI konformacijų ir sąveikos su specifine DNR orientacijų nustatymui); (ii) visiško vidinio atspindžio fluorescencijos mikroskopo FRET eksperimentai (BcnI sąveikos su specifine ir nespecifine DNR dinamikos tyrimui); (iii) visiško vidinio atspindžio fluorescencijos mikroskopo ir magnetinio „pinceto“ eksperimentais nustatyti ir charakterizuoti BcnI 'palengvintosios difuzijos' tipai; (iv) magnetinio pinceto pagalba, vykdyta pavienių DNR molekulių hidrolizė restrikcijos endonukleaze BcnI.

### **Darbo galima praktinė reikšmė**

Pavienių molekulių tyrimo metodai, aprašyti šiame darbe, gali būti sėkmingai pritaikyti kitų su DNR sąveikaujančių baltymų tyrimui, įskaitant DNR polimerazes, CRISPR-Cas endonukleazes ir daugelį kitų DNR modifikuojančių fermentų, kurie naudojami kaip molekuliniai įrankiai genų inžinerijoje ir genomo redagavimui. Gautos žinios, nustačius monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmą, leido sukurti grandinei specifinius, vieną dvigrandinę trūkį įvedančius fermentus (Kostiuk et al., 2011).



### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

- Monomerinė restrikcijos endonukleazė, vieną po kitos, hidrolizuoja specifinio taikinio 5'-CCSGG-3' grandines;
- Po pirmosios specifinio taikinio grandinės hidrolizės - BcnI orientacijos pakeitimas ant DNR vyksta be disociacijos į tirpalą.
- Specifinio taikinio suradimui ir orientacijos pakeitimui, BcnI naudoja „palengvintosios“ difuzijos mechanizmą;
- BcnI konformacijos apibrėžtumas ir atpažinimo bei katalitinio subdomenų išsidėstymas priklauso nuo sąveikos su DNR ir divalenčiais metalo jonais.

## TYRIMŲ METODIKA

**Fermentai.** DNR modifikuojantys fermentai modifying enzymes (T4 polinukleotidkinazė, T4 DNR ligazė, restrikcijos endonukleazės ir polimerazės) buvo pagamintos ThermoFischer Scientific ir New England Biolabs. Visi šie produktai naudoti atsižvelgiant į gamintojo rekomendacijas.

**Buferiai ir tirpalai.** „A+0.1 buferis“: 10 mM K-fosfato (pH 7.0 esant 25 °C), 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA. „A+0.2 buferis“: 10 mM K-fosfato (pH 7.0 esant 25 °C), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA. „A+1 buferis“: 10 mM K-fosfato (pH 7.0 esant 25 °C), 1 M NaCl, 1 mM EDTA. „Saugojimo buferis“: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4 esant 25 °C), 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 % glicerolio. „Žymėjimo buferis“: 100 mM K-fosfato (pH 6.9 esant 25 °C), 100 mM NaCl, 1 mM TCEP. „Matavimo buferis“ 33 mM Tris-acetato, 66 mM K-acetato, (pH 7.9 at 25 °C), 0.1 mM EDTA, 0.02 mg/ml gliukozės oksidazės, 0.008 mg/ml katalazės, 20 mM gliukozės, 0.1 mg/ml JSA, sotus TROLOX tirpalas. „Reakcijos buferis“: 33 mM Tris-acetato, 66 mM K-acetato (pH 7.9 esant 25 °C), 0.1 mM EDTA. „Susirišimo buferis“: 40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant 25 °C), 5 mM Ca-acetato, 0.1 mg/ml JSA, 10 % glicerolio. „EMSA buferis“: 40 mM Tris-acetato (pH 8.3 esant 25 °C). „NBE buferis“: 0.1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.1 M NaOH, 0.2 mM EDTA, 15 mM Na-acetato, pH 8.0 at 25 °C. „PBS buferis“: 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM fosfato, pH 7.4 esant 25 °C, (Sigma). „TAE buferis“: 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7.9 esant 25 °C. „TBE buferis“: 0.1 M Tris-H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, pH 8.3 at 25 °C. „Nedenatūruojantis STOP tirpalas“: 75 mM EDTA (pH 8.0 esant 25 °C), 0.01 % bromfenolio mēlis (w/v), 0.1 % NDS, 50 % (v/v) glicerolio. „Denatūruojantis STOP tirpalas“: 95 % (v/v) formamido, 25 mM EDTA (pH 8.0 esant 25 °C), 0.01 % bromfenolio mēlis (w/v). „Neutralizacijos tirpalas“ (3.5 M Tris ir 3 % NDS). „NDS užnešimo tirpalas“: 100 mM Tris-HCl (pH 6.8 esant 25 °C), 4 % NDS (w/v), 200 mM DTT, 20 % (v/v) glicerolio. „BE1 buferis“: 125 mM Tris-HCl (pH 6.8 esant 25 °C), 0.1 % NDS (w/v). „BE2 buferis“: 375 mM Tris-HCl (pH 8.8 esant 25 °C), 0.1 % NDS (w/v). „BE3 buferis“: 25 mM Tris, 190 mM glicino (pH 8.3 at 25°C), 0.1 % NDS (w/v). „Akrilamido tirpalas I“: akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (37.5:1 (w/w)) tirpalas. „Akrilamido tirpalas II“: akrilamido/N,N'-metilenbisakrilamido (29:1 (w/w)) tirpalas.

**DNA oligonukleotidai.** Šiame darbe naudoti nemodifikuoti DNR oligonukleotidai buvo susintetinti „Metabion“ (Martinsried, Vokietija). Oligonukleotidai turintys modifikuotus oligonukleotidus susintetinti „Sigma“. DNR oligodupleksai (Lentelė 1) buvo gaunami sulydant atitinkamus viengrandinius DNR oligonukleotidus. Viengrandinį trūkį turintys oligodupleksai buvo gaunami sulydžius tris atitinkamus DNR oligonukleotidus. Gaminant radioaktyviais izotopais žymėtus substratus, prieš sulydymą reikiama DNR grandinė buvo žymima 5'-gale <sup>33</sup>P-fosfatu panaudojant T4 polinukleotidkinazę ir [ $\gamma^{33}$ P]ATP („Hartman analytic“).

Lentelė 1. Eksperimentuose naudoti modifikuoti ir nmodifikuoti oligonukleotidai.

Seka (5' -> 3')	Oligonukleotidų aprašymas	Oligonukleotidų paskirtis
5' -cttcgcagtacg <b>CCG</b> -- <b>GG</b> caataacgcacgt-3' 3' -gaagcgtcatgc <b>GGC</b> p <b>CC</b> gttattgcgtgca-5'	„C-nick”: 30 bp BcnI specifinis dupleksas, ‘C’ grandinėje turintis viengrandinį trūkį. „p” žymi 5'-terminalinį fosfatą trūkio vietoje.	Viengrandinį trūkį turintys oligodupleksai.
5' -cttcgcagtacg <b>CC</b> p <b>GGG</b> caataacgcacgt-3' 3' -gaagcgtcatgc <b>GG</b> -- <b>CCC</b> gttattgcgtgca-5'	„G-nick”: 30 bp BcnI specifinis dupleksas, ‘G’ grandinėje turintis viengrandinį trūkį. „p” žymi 5'-terminalinį fosfatą trūkio vietoje.	
5' -cttcgcagtacg <b>CCGGG</b> caataacgcacgt-3' 3' -gaagcgtcatgc <b>GGCCC</b> gttattgcgtgca-5'	DNA „TRAP” oligodupleksas: 30 bp specifinis DNR substratas naudotas DNA-„gaudyklės” eksperimentuose.	DNR „gaudyklės” eksperimentų substratai
5' -cgcacgactt <b>CCCGG</b> aagagcacgc-3' 3' -gcgctgctgaa <b>GGGCC</b> ttctcgtgcttg-5'	Specifinis BcnI oligodupleksa	DNR substratai naudoti baltymo ir DNR sąveikos tyrimui elektroforetinio judrumo poslinkio metodu.
5' -cgcacgacttgtcacaagagcacgc-3' 3' -gcgctgctgaacagtgttctcgtgcttg-5'	Nespecifinis BcnI oligodupleksa	
5' -gg <b>M</b> ttcagcgttattg <b>CCCGG</b> cgtactgagagaaaagg-3' 3' -ccaaaagtcgcaataac <b>GGGCC</b> gcatgacgctcttttcc-5'	C-DNA-Alexa546, M=dT-Alexa546	BcnI - DNA sąveikos orientacijos FRET eksperimentų substratai.
5' -gg <b>T</b> tttcagcgttattg <b>CCCGG</b> cgtactgagagaaaagg-3' 3' -ccaaaagtcgcaataac <b>GGGCC</b> gcatgacgctctt <b>M</b> tcc-5'	G-DNA-Alexa546, M=dT-Alexa546	
5' -gg <b>T</b> tttcagcgttattg <b>CCCGG</b> cgtactgagagaaaagg-3' 3' -ccaaaagtcgcaataac <b>GGGCC</b> gcatgacgctcttttcc-5'	SP DNR	Kvantinės išėigos ir anizotropijos matavimų specifinis oligodupleksas
5' -gctgacgcggagtatttggtat <b>CCCGG</b> ctctgctgaagccagttaccttcggaaacg-3' 3' -cgactgcgctcataaaccata <b>GGGCC</b> gagacgacttcggtcaatggaagcctttgc-5'	Specifinis BcnI oligodupleksa	BcnI konformacijos FRET eksperimentų substratai
5' -gg <b>T</b> gacgcggagtatttggtatgattcctctgctgaagccagttaccttcggaaacg-3' 3' -ccactgcgctcataaaccataactaaggagacgacttcggtcaatggaagcctttgc-5'	Nespecifinis BcnI oligodupleksa	
5' - <b>M</b> ttcagcgttattg <b>CCCGG</b> cgtactgagagaaaagg-3' 3' -aaagtcgcaataac <b>GGGCC</b> gcatgacgctcttttcc <b>B</b> -5'	C-DNA-Cy5, M=dT-Cy5, B=biotinas	BcnI-DNR sąveikos dinamikos FRET eksperimentų substratai.
5' - <b>B</b> ggttttcagcgttattg <b>CCCGG</b> cgtactgagagaaa-3' 3' - ccaaaagtcgcaataac <b>GGGCC</b> gcatgacgctctt <b>M</b> -5'	G-DNA-Cy5, M=dT-Cy5, B=biotinas	
5' -gaagtg <b>CCCGG</b> caatacgtactgcttagcagtacgtattg <b>CCGGG</b> ca-3'	„Plaukų segtuko” DNR oligonukleotidas turintis BcnI atpažinimo seką.	Oligonukleotidas panaudotas BcnI procesyvumo nustatymo DNR konstruktui.

**Plazmidės.** pBAD24–R.BcnI: vektorius naudojamas BcnI baltymų atrankai ir raiškai, suteikiantis atsparumą ampicilinui ( $Ap^R$ ). pACYC184–M.BcnIB: vektorius turintis M.BcnIB metiltransferazės geną, apsaugantis kamieno genomą nuo R.BcnI hidrolizės, suteikiantis atsparumą chloramfenikoliui ( $Cm^R$ ). T7 bakteriofago DNR, pBluescript SK+ ir pBluescript II SK+ naudoti DNR substratų vienos molekulės eksperimentams konstravimui.

**Kamienas.** *E.coli* K12 ER2267 ( $Kn^R$ ).

**Baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms.** Baltymų mėginiai 1:1 buvo sumaišomi su „NDS užnešimo tirpalu“, gauti mišiniai prieš elektroforezę 3 min. kaitinti 95°C. Pavyzdžiai buvo frakcionuojami 1-1.5 h (30V/cm) „BE3 buferyje“. Koncentruojančio ir frakcionuojančio gelių sudėtis atitinkamai 4% „Akrilamido tirpalas I“ „BE1 buferyje“ ir 12-15% „Akrilamido tirpalas I“ „BE2 buferyje“ (Sambrook et al., 1989). Geliai nudažyti su Page Blue baltymų dažymo tirpalu (Thermo Fisher Scientific), buvo nufotografuoti su Biometra BioDocAnalyze skaitmenine kamera.

**Agarozės elektroforezė nedenatūruojančiomis sąlygomis.** Skirtingų DNR fragmentų arba skirtingų plazmidžių formų atskyrimas buvo vykdomas 0.7 –1.5 % agarozės geliuose „NBE buferyje“ turinčiame 0.5 µg/ml etidžio bromido. DNR pavyzdžiai buvo sumaišomi su 1/3 tūrio „nedenatūruojančio STOP tirpalo“. Skaitmeniniai vaizdai gauti gelį apšvietus UV lempa ir nufotografavus su Biometra BioDocAnalyze skaitmenine kamera.

**Elektroforezė poliakriliniame gelyje esant nedenatūruojančioms sąlygoms.** Radioaktyviais izotopais žymėti oligodupleksai buvo sumaišomi su įvairiais baltymo kiekiais „surišimo buferyje“, gauti mišiniai palaikomi 10 min „surišimo buferyje“ ir 3 h kambario temperatūroje frakcionuojami gelyje (8% „Akrilamido tirpalas II“ „EMSA buferyje“) „EMSA buferje“ esant 6V/cm lauko stiprumui. Po elektroforezės geliai buvo džiovinami, o radioaktyvi DNR detektuojama fluorescencinių ekranų („FujiFilm“) ir Cyclone™ skenerio („Packard Instruments“) pagalba. Skirtingi DNR kiekiai buvo detektuojami OptiQuant 3.0 kompiuterine programa (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

**Elektroforezė poliakriliniame gelyje esant denatūruojančioms sąlygoms.** Radioaktyviais izotopais žymėtų DNR oligodupleksų hidrolizės produktų nustatymui, mėginiai buvo sumaišomi 1:1 su „Denatūruojančiu STOP tirpalu“, 4 min kaitinti 95°C ir atšaldyti lede. Elektroforezė buvo vykdoma 1 h esant 30 V/cm lauko stiprumui be mėginių ir 3-4 h su DNA mėginiais „TBE buferyje“ 20 % „Akrilamido tirpalo II“ gelyje turinčiame 8.5 M karbamido. Po elektroforezės geliai buvo džiovinami, o radioaktyvi DNR detektuojama fluorescencinių ekranų („FujiFilm“) ir Cyclone™ skenerio („Packard Instruments“) pagalba. Skirtingi DNR kiekiai buvo detektuojami OptiQuant 3.0 kompiuterine programa (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA).

**BcnI geno mutagenėzė.** Taškinės aminorūgščių mutacijos įvestos pagal „QuickChange“ mutagenėzės protokolą (Zheng, 2004). PGR reakcijos su persidengiančiais pradmenimis turinčiais tikslinę mutaciją buvo atliekamos nuo pBAD24\_R.BcnI(wt) plazmidės (Kostiuk et al., 2011). PGR reakcijos buvo hidrolizuojamos su DpnI REaze ir transformuotos į *E.coli* kamieną pagal  $CaCl_2$  metodą (Sambrook et al., 1989). Tikslinių mutacijų įvedimas patvirtintas nusekvenavus visą *bcnIR* geną.

**BcnI baltymų raiška.** BcnI baltymai buvo išreikšti *E.coli* K12 ER2267( $Kn^R$ ) kamiene turinčiame pACYC184( $Cm^R$ )-M.BcnIB ir pBAD24( $Ap^R$ )-R.BcnI plazmidės. Bakterijos augintos LB terpėje su atitinkamais antibiotikais 37 °C iki  $A_{600}$  0.7. Baltymų ekspresija buvo indukuojama 0.2 % arabinozės. Po 4 val ląstelės nucentrifuguotos ir saugomos -20 °C.

**BcnI baltymų gryninimas.** *E. coli* K12 ER2267( $Kn^R$ ) bakterijos su ekspresuotu BcnI REazės baltymu resuspenduotos „A+0.1 buferyje“ turinčiame 7 mM 2-ME bei suardytos ultragarsu. Tirpi fazė su tiksliniais baltymais atskirta centrifuguojant 1 h 35000 g. BcnI baltymai paeiliui buvo gryninami per fosfoceliuliozės P11 (Whatman), Blue Sepharose ir Heparin Sepharose (Amersham Biosciences) jonų mainų chromatografijos kolonėles naudojant linijinį NaCl gradientą („A+0.2“ ir „A+1“ buferiai su 7 mM 2-ME ). Po kiekvieno gryninimo etapo BcnI buvimas frakcijose detektuojamas baltymų elektroforeze poliakrilamidiniame gelyje. Išgryninti BcnI baltymai dializuoti prieš „Saugojimo buferį“ ir laikomi -20 °C temperatūroje.

**BcnI baltymų žymėjimas viengubas fluorescentinėmis žymėmis.** BcnI cisteininių mutantų (BcnI(N18C+C202S), BcnI(V105C+C202S), BcnI(C202S+K209C)) „Saugojimo buferis“ buvo pakeistas į „Žymėjimo buferį“, baltymus 5 kartus koncentruojant per Amicon Ultra 10k centrifuginius filtrus nuo 500  $\mu$ l iki 50  $\mu$ l, tarp koncentravimų pridėdama 450  $\mu$ l „Žymėjimo buferio“. Buferio pakeitimas pašalina glicerolį (lėtinantį reakciją) ir DTT (kuris konkuruoja su cisteiniais, reaguojant su maleimidu), bei įvedamas TCEP, kuris redukuoja tikslinius cisteinus. Žymėjimo reakcija buvo atliekama 2h esant 25°C „Žymėjimo buferyje“ sumaišius 20  $\mu$ M BcnI su 200  $\mu$ M arba 400  $\mu$ M AlexaFluor488-C<sub>5</sub>-maleimide (ThermoFisher Scientific), AlexaFluor546-C<sub>5</sub>-maleimide (ThermoFisher Scientific) arba Cy3MonoMaleimide (GE Healthcare) fluorescentiniu dažu. Reakcija stabdoma pridėjus 40  $\mu$ M 2-ME ir užnešama ant Heparin HP (GE Healthcare) kolonėlės. Laisvas dažas nuo kolonėlės atplaunamas su „A+0.2 buferiu“, žymėtas baltymas nuo kolonėlės atplaunamas su „A+1“ buferiu ir koncentruojamas prieš „saugojimo buferį“. Naudojant šią metodiką gaunamas biotininis BcnI reaguojant BcnI(V105C+C202S) su maleimid-PEG<sub>2</sub>-biotinu (Thermo Fisher Scientific).

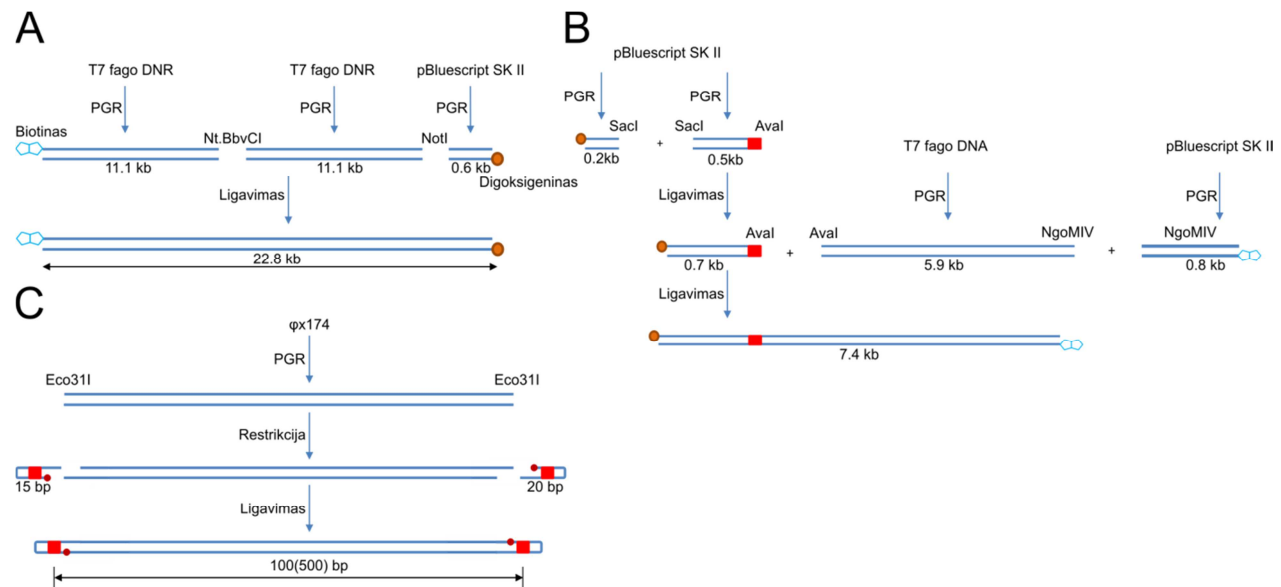
**BcnI baltymų dvigubas žymėjimas fluorescentinėmis žymėmis.** Pakeitus „Saugojimo buferį“ į „Žymėjimo buferį“ 20  $\mu$ M BcnI(N18C+V105C+C202S) ir 40  $\mu$ M AlexaFluor488-C<sub>5</sub>-maleimide (ThermoFisher Scientific) inkubuota 2h 25°C. Sustabdžius reakciją 40  $\mu$ M 2-ME, nežymėtas, viengubai žymėtas ir dvigubai žymėtas BcnI chromatografiškai atskirtas per Mono-S (GE Healthcare) jonų mainų kolonėlę (250-550 mM NaCl gradientas, 40 kolonėlės tūrių). Viengubai žymėtas baltymas inkubuotas su 10x moliniu pertekliumi AlexaFluor546-C<sub>5</sub>-maleimide (ThermoFisher Scientific) „Žymėjimo buferyje“ 2h esant 25°C. Dvigubai žymėtas baltymas grynintas per Heparin HP (GE Healthcare) kolonėlę kaip viengubai žymėti BcnI baltymai.

**Pažymėjimo laipsnio nustatymas.** Baltymų ir fluoroforų koncentracijos paskaičiuotos iš absorbcijų esant maksimaliam sugerties bangos ilgiui (BcnI( $A_{280}$ ), Alexa488( $A_{495}$ ), Alexa555( $A_{556}$ )) pagal Lambert-Beer dėsnį. Pažymėjimo laipsniai buvo paskaičiuoti kaip fluoroforo ir baltymo koncentracijų santykis atsižvelgiant į fluoroforo

absorbciją  $A_{280}$  pagal gamintojo instrukcijas (ThermoFisher Scientific). Visi pažymėti baltymai ir jų pažymėjimo laipsniai surašyti Lentelėje 3.

**DNR konstruktas BcnI vienmatei difuzijai stebėti.** Nespecifinis DNR konstruktas, pagamintas suligavus T7 fago DNR du 11.1 kb PGR produktus (pirmo PGR produkto 5' galas biotinilintas) per Nt.BbvCI hidrolizės DNR galus. 0.6 kb digoksigenu modifikuotas DNR fragmentas suliguotas su antruoju 11.1 kb PGR fragmentu per NotI hidrolizės DNR galus (1A paveikslas).

**DNA konstruktas pavienių DNR molekulių hidrolizės eksperimentams.** 7.4 kb DNR konstruktas, tinkantis pavienių DNR molekulių hidrolizės eksperimentams su magnetiniu pincetu, buvo gautas suligavus 5.9 kb PGR produktą (matrica–T7 fago DNA), 450 bp PGR produktą (matrica–pBluescriptIISK+) ir du PGR produktus, modifikuotus su biotinilintais arba digoksigenu modifikuotais deoksinukleotidais (matrica–pBluescriptIISK+) (1B paveikslas).



**1 paveikslas. DNA konstruktai.** (A) 22.8 kbp nespecifinis DNR konstruktas naudotas vienmatės difuzijos eksperimentuose (žr. 2.7.1.) (B) 7.4 kbp DNR konstruktas naudotas pavienių DNR molekulių hidrolizės eksperimentuose (žr. 2.8.3.). (C) Radioaktyviais izotopais žymėti dvitaikiniai substratai „135“ ir „535“ naudoti BcnI procesyvuose eksperimentuose (žr. 2.7.2.).  $^{33}\text{P}$ -fosfatai pažymėti tamsiai raudonais taškais, BcnI atpažinimo seka pažymėta raudonais keturkampiais. Restrikcijos endonukleazės naudotos DNR konstravimui, pažymėtos prie atitinkamų DNR fragment galų (A-C).

**DNR konstruktas su 2 BcnI specifiniais taikiniais.** DNR konstruktai su 2 BcnI specifiniais taikiniais „135“ (100 bp tarp BcnI taikinių) ir „535“ (500 bp tarp BcnI taikinių) buvo gauti suligavus Eco31I hidrolizuotus PGR produktus (matrica  $\phi\text{X174}$  RFL DNA) su  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  5'-žymėtu „plaukų segtuko“ formos oligonukleotidais, turinčiais BcnI atpažinimo seką (Lentelė 1). Nesuligavę DNR produktai buvo pašalinti T7 polymerazės



3'=>5' egzonukleazės aktyvumu, kuri degradoja visus laisvus 3' DNR galus. Pilnai susilgavęs konstruktas išgryninamas iš 1 % agarozės gelio „TAE buferyje“ (1C paveikslas).

**Baltymo ir DNR sąveikos tyrimas elektroforetinio judrumo poslinkio metodu.** Šiuose eksperimentuose buvo naudoti <sup>33</sup>P izotopu pažymėti specifinis ir nespecifinis dupleksai (Lentelė 1). Įvairūs BcnI baltymų (wt, žymėti ir nežymėti Cys mutantai) kiekiai buvo inkubuojami su DNR dupleksais (0.1 nM) „Susirišimo buferyje“ 10 min, esant kambario temperatūrai. Laisva DNR ir baltymo-DNR kompleksai buvo atskiriami frakcionuojant 8% poliakrilamidiniame gelyje esant nedematūruojančioms sąlygoms kaip aprašyta anksčiau. BcnI sąveikos su specifine DNR  $K_D$  reikšmės paskaičiuotos naudojant KYPLOT 2.0 kompiuterinę programą pagal metodiką aprašytą straipsnyje (Tamulaitis et al., 2006).

**BcnI ir superspiralizuotos dvigrandininės DNR reakcijos.** Greitos „vienos apskukos“ kinetinės reakcijos buvo atliekamos sustabdytos tėkmės prietaisu Kin-Tek RQF-3 esant 25°C temperatūrai „Reakcijos buferyje“, turinčiame 0.1 mg/ml JSA. „Pre-mix“ sąlygomis - BcnI prieš reakciją buvo preinkubuojamas su phiX174 DNR (16 µl) ir reakcija buvo inicijuojama Mg-acetatu (16 µl). „Post-mix“ sąlygomis - reakcija inicijuojama sumaišant phiX174 DNR (16 µl) ir BcnI+Mg-acetato (16 µl) tirpalus. „Gaudyklės“ reakcijos buvo atliekamos „pre-mix“ sąlygomis ir inicijuojamos Mg-acetatu+30/30 „TRAP“ DNR arba Mg-acetatu+BcnI(D55A). Po pasirinktų laiko intervalų reakcija stabdoma 6 M guanidino chloridu. Reakcijos mėginiai (100 µl) sumaišyti su 60 µl „Nedematūruojančio STOP tirpalo“ ir frakcionuojami per agarozės elektroforezę nedematūruojančiomis sąlygomis. Galutinis reakcijos mišinys yra sudarytas iš 2 nM phiX174 DNA, 200 nM BcnI ir 10 mM Mg-acetato. DNR ir Baltymo „gaudyklės“ eksperimentuose reakcijos mišinyje papildomai yra 4 µM DNR „TRAP“ oligoduplekso arba 16 µM BcnI(D55A). phiX174 dvigrandininės DNR hidrolizės produktai buvo analizuojami kaip dvi pirmo laipsnio reakcijos (lygtis (1)). Lygčių, išreiškiančių superspiralizuotos DNR ([SS]), DNR su viengrandiniu trūkiu ([VT]) ir linijinės DNR (L) kiekius (lygtys (2)-(4)), pagalba buvo paskaičiuotos pirmosios ( $k_1$ ) ir antrosios ( $k_2$ ) DNR grandinių hidrolizės konstantos:

$$SS - k_1 \rightarrow VT - k_2 \rightarrow L \quad (1)$$

$$[SS] = [SS]_0 \times \exp(-k_1 \times t) \quad (2)$$

$$[VT] = [VT]_0 \cdot \left( \frac{k_1}{k_1 - k_2} \right) \cdot \{ \exp(-k_2 \cdot t) - \exp(-k_1 \cdot t) \} \quad (3)$$

$$[L] = [SS]_0 - [SS] - [VT] \quad (4)$$

Reakcijos „stacionariosiomis sąlygomis“ buvo atliekamos 25°C temperatūroje „Reakcijos buferyje“, turinčiame 0.1 mg/ml JSA, 2 nM phiX174 DNA ir 0.1 nM BcnI. Reakcija inicijuota 10 mM Mg-acetato. Po pasirinktų laiko intervalų, mėginiai (25 µl) buvo sumaišomi su 8 µl „Nedematūruojančio STOP tirpalo“ ir frakcionuojami per agarozės elektroforezę nedematūruojančiomis sąlygomis. Skirtingų DNR formų (superspiralizuota DNR, DNR su viengrandiniu trūkiu ir DNR su dvigrandininiu trūkiu) kiekis buvo nuskenotas naudojant 1D Main kompiuterinę programą (Advanced American

Biotechnology, Fullerton, CA, USA). Regresinė analizė atlikta naudojant KyPlot 2.0 kompiuterinę programą (Yoshioka, 2002).

**Kinetiniai eksperimentai su oligonukleotidiniais substratais.** „Vienos apsukos“ kinetinės reakcijos buvo atliekamos „pre-mix“ sąlygomis „Reakcijos buferyje“, turinčiame 0.1 mg/ml JSA, 4 nM radioizotopais žymėtų 30 bp G-nick arba 30 bp C-nick viengrandininį trūkį turinčių oligodupleksų preinkubuotų su 200 nM arba 400 nM BcnI(wt) ir, inicijuojamos 10 mM Mg-acetatu. Reakcijos buvo atliekamos sustabdytos tėkmės prietaisu Kin-Tek RQF-3 (kaip aprašyta anksčiau). Reakcijoms stabdyti naudota 2 M HCl, po to mėginiai (100 µl) sumaišyti su 45 µl „Neutralizacijos tirpalo“ ir 60 µl „Denatūruojančio STOP tirpalo“, o reakcijų produktai frakcionuoti elektroforeze poliakriliniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. Įvairių DNR formų kiekiai įvertinti OptiQuant 3.0 kompiuterine programa (Perkin Elmer, Wellesley, USA). Regresinė analizė atlikta naudojant KyPlot 2.0 kompiuterinę programą (Yoshioka, 2002).

**Kinetiniai eksperimentai su DNR konstruktu, turinčiu 2 BcnI specifinius taikinius.** Reakcijos stacionariosiomis sąlygomis buvo atliktos „Reakcijos buferyje“ su 0.1 mg/ml JSA, 10 mM Mg-acetato, 100 nM ‘135’ arba ‘535’ DNR substratu (4 nM žymėto radioaktyviais izotopais+96 nM nežymėto). Reakcija buvo inicijuojama pridėdant 1 nM BcnI(wt). Po pasirinktų laiko intervalų 8 µl reakcijos mėginiai buvo stabdomi 14 µl „Nedenatūruojančio STOP tirpalo“ ir elektroforetiškai frakcionuojami 6 % poliakrilamidiniame gelyje esant nedenatūruojančioms sąlygoms 20 h. Nehidrolizuotų substratų (SS), substratų su 1 hidrolizuotu (PS) ir substratų su 2 hidrolizuotais taikiniiais (PP) kiekiai įvertinti OptiQuant 3.0 kompiuterine programa (Perkin Elmer, Wellesley, USA). BcnI molekulių procesyvumo faktoriai paskaičiuoti pagal formulę:  $k(P_{accumulation})/(k(P_{accumulation})+k(P_{accumulation}))=k(P_{accumulation})/k(SS_{cleavage})=|v_{PP}/v_{SS}|$  (žr. 2.7.2.).

**Fluorescencijos anizotropijos matavimai.** Fluoroforais žymėtų BcnI baltymų anizotropija buvo matuojama žadinant ir emisija detektuojant pastovių bangos ilgių metodu ( $\lambda_{ex}=480$  nm,  $\lambda_{em}=515$  nm,  $t(\text{integracijos})=5$  s), naudojant Fluoromax3 prietaisą. Matavimams naudota 0.5 µM fluoroforu žymėto BcnI baltymo arba DNR „Reakcijos buferyje“. Fluorescencijos anizotropijos ( $r$ ) reikšmės (Lentelė 3) buvo paskaičiuotos pagal (5)-(6) formules:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (5)$$

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (6)$$

Išraiška  $I_{VH}$  reiškia horizontaliai ( $H$ ) poliarizuotas fluorescencijos emisijos intensyvumą ( $I$ ) žadint vertikalčiai ( $V$ ) poliarizuota šviesa (Lakowicz, 2006).

**Fiorsterio spindulio nustatymas.** Fiorsterio rezonansinės energijos pernaša (FRET) priklauso nuo atstumo tarp donoro ir akceptoriaus. (lygtis (7)). Fiorsterio spindulys ( $R_0$ ) yra



atstumas tarp donoro ir akceptoriaus kuriam esant FRET efektyvumas lygus 0.5.  $R_0$  paskaičiuojamas pagal formulę (8).

$$E = \frac{r^6}{r^6 + R_0^6} \quad (7)$$

$$R_0 = \sqrt[6]{\frac{9000 * \ln 10}{128\pi * N_A} * \phi_D * \kappa^2 * n^{-4} * J} \quad (8)$$

kur  $N_A$  yra Avogadro skaičius,  $\phi_D$  - donoro kvantinė išeiga,  $\kappa^2$  - dipolio orientacijos faktorius (2/3 pagal (Stryer, 1978)),  $n$  - terpės lūžio rodiklis ( $n=1.34$ ),  $J$  – donoro emisijos ir akceptoriaus absorbcijos spektrų persidengimo integralas.  $\phi_D$  ir  $J$  reikšmės paskaičiuotos pagal (Theissen et al., 2008).  $\phi_D$  ir  $R_0$  reikšmės pateiktos Lentelėje 3.

**FRET duomenų analizė.** FRET efektyvumas apibūdinamas kaip donoro energijos pernašos akceptoriumi greitis, padalintas iš visų procesų, kurie sužadintą donoro elektroną grąžina į  $S_0$  būseną, greičių (Lakowicz, 2006). Matuojant FRET efektyvumą, donoras-fluoroforas yra žadinamas ir du fluorescencijos intensyvumai yra matuojami vienu metu: (i) donoro intensyvumas  $I_{DD}$  (žadinant donoro bangos ilgiu) ir (ii) akceptoriaus intensyvumas  $I_{DA}$  (žadinant donoro bangos ilgiu). Realios FRET efektyvumo reikšmės paskaičiuojamos (lygtis (9)) detekuojamus signalus perskaičiavus, atsižvelgiant į foninę emisijos detekciją, akceptoriaus emisiją donoro detekcijos kanale ( $\alpha$ ), donoro emisiją akceptoriaus detekcijos kanale ( $\beta$ ), tiesioginį akceptoriaus žadinimą donoro bangos ilgiu ( $\delta$ ) bei skirtingas donoro ir akceptoriaus kvantines išeigas, skirtingus kanalų detekcijos jautrumus ( $\gamma$ ) (Gust et al., 2014; Hohlbein et al., 2014; Theissen et al., 2008).

$$E_{FRET} = \frac{(I_{DA} - \alpha * I_{DD}) - \gamma\delta(I_{DD} - \beta * I_{DA})}{(I_{DA} - \alpha * I_{DD}) + \gamma(I_{DD} - \beta * I_{DA})} \quad (9)$$

Gauti FRET reikšmių skirstiniai aproksimuoti Gauss'o skirstiniais. Duomenys pateikti Lentelėje 4.

**Konfokaliniai pavienių molekulių FRET eksperimentai.** Siekiant nustatyti BcnI konformacines būsenas 25-50 pM BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546 buvo sumaišyta su 1-10 nM specifinio (SP) arba nespecifinio (NSP) DNR oligoduplekso 50µl „Reakcijos buferyje“. BcnI sąveikos su specifine seka orientacijos nustatymui 50 pM BcnI(N18C+C202S)-Alexa488, BcnI(V105C+C202S)-Alexa488 arba BcnI(C202S-K209C)-Alexa488 buvo sumaišyta su Alexa546-C-DNA arba Alexa546-G-DNA oligodupleksais 50µl „Reakcijos buferyje“. Eksperimentai atlikti naudojant invertuotą konfokalinį mikroskopą Zeiss LSM 780 (žr. 2.6., 2.8.1.). Mėginiai buvo žadinami 488 nm lazeriu, o donoro ir akceptoriaus signalai detekuojami Confocor 3 detektoriumi.  $E_{FRET}$  duomenų analizė atlikta kaip aprašyta anksčiau.

**Visiško vidinio atspindžio pavienių molekulių FRET eksperimentai.** Eksperimentai buvo atliekami biotinilintu polietilenglikoliu padengtose eksperimentinėse celėse (Roy et al., 2008) naudojant kombinuotą magnetinio pinceto-FRET prietaisą (Kemmerich et al., 2015). Eksperimentinėse celėse „Matavimo buferyje“ su 10 mM Ca-

acetatu, 0.1 nM Cy5 žymėtas biotinilintas oligodupleksas, imobilizuotas per streptavidiną. Oligonukleotido lokalizacijos nustatymui eksperimentinė celė buvo žadinama 43 mW 642 nm. Po to eksperimentinė celė buvo žadinama 50 mW 532 nm ir į celę užneštas BcnI(N18C+C202S)-Cy3. Cy3 ir Cy5 fluoroforų emisijos buvo spektriškai perskirtos ir detektuotos iXon 897-D EMCCD kamera (Andor, Belfast, Ireland). Duomenys surinkti naudojant LabView (National Instruments, Austin, United States) programą, kolokalizuoti Cy3 ir Cy5 fluorescencijos signalai buvo atrinkti, jų intensyvumai aproksimuoti 2D Gauso skirstiniais, o FRET efektyvumai paskaičiuoti (kaip aprašyta anksčiau) naudojant MATLAB programą (MathWorks, Natick, United States) (žr. 2.8.2.).

**BcnI 1D difuzijos eksperimentai ant pavienių DNR molekulių.** Eksperimentinių celių paruošimas, kombinuotas TIRF-magnetinio pinceto prietaisas ir duomenų analizė detalai aprašyta (Schwarz et al., 2013). Ilgam fluorescentiniam BcnI signalui stebėti, eksperimentai buvo atliekami su BcnI(V105C+C202S)-maleimid-PEG<sub>2</sub>-biotino konjugatu pažymėtu kvantiniu tašku, padengtu streptavidinu (Qdot®625, Molecular Probes, Life Technologies, diametras 20 nm). 0.1-0.2 nM gauto konjugato buvo užnešta į eksperimentinę celę ir BcnI vienmatė difuzija stebima ant paraleliai celės paviršiui orientuoto 22.8 kb nespecifinio DNR konstrukto. DNR konstruktas, viename gale žymėtas digoksigeninu, o kitame gale – biotinu, po inkubacijos su streptavidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1), buvo imobilizuotas ant antidigoksigeninu padengtos eksperimentinės celės ir, veikiant magnetu, ištemptas išilgai celės paviršiui. Tarp celės paviršiaus ir DNR konstrukto susidarančio 5° kampo, DNR konstrukto projekcijos 0.5% ilgio sumažėjas į 1D difuzijos koeficientų skaičiavimus įtrauktas nebuvo. Mėginys „Reakcijos buferyje“, turinčiame 0.02 mg/ml gliukozės oksidazės, 0.008 mg/ml katalazės, 20 mM gliukozės, 0.1 mg/ml JSA ir 14 mM 2-ME buvo žadinamas 10 mW 488 nm lazeriu, esant visiško vidinio atspindžio geometrijai (angl. total internal reflection). BcnI molekulių pozicijos buvo analizuojamos FIESTA programa (Ruhnow et al., 2011). 1D difuzijos koeficientai paskaičiuoti iš baltymo vidutinio kvadratinio pasiskirstymo nuo laiko priklausomybių (12A paveikslas). Vienmatės baltymo difuzijos trajektorijos laike (kymogramos) (11B paveikslas) buvo gautos ImageJ programa (Schneider et al., 2012) (žr. 2.7.1.).

**Pavienių DNR molekulių hidrolizės eksperimentai.** Pavienių DNR molekulių nikavimo ir hidrolizės eksperimentai buvo atliekami naudojant magnetinį pincetą (van Aelst et al., 2010; Ramanathan et al., 2009). 7.4 kb DNR konstruktas per digoksigenino-antidigoksigenino sąveiką buvo imobilizuotas ir orientuotas (per streptavidinu dengtą 1 μm magnetinę dalelę (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1)) 2 pN magnetiniu lauku (Daldrop et al., 2015) statmenai eksperimentinės celės paviršiui (Kemmerich, Kasaciunaite, & Seidel, 2016). DNR molekulės ilgis įvertintas iš kontrolinių polistireninių nemagnetinių 3 μm dalelių ant celės paviršiaus ir magnetinės dalelės difrakcinių vaizdų. (Huhle et al., 2015; Otto et al., 2010). Individualios DNR molekulės buvo teigiamai superspiralizuotos apsukant jas 25 kartus veikiant 2 pN jėgai. Į celę su „Matavimo buferiu“ turinčiu 10 mM Mg-acetato užnešta 0.2-1 nM BcnI(N18C+C202S) ir videomikroskopijos pagalba stebimas DNA ilgis. Nikuota DNR pailgėdavo dėl susukimo relaksacijos, o perkirpus antrąją DNR

grandinę magnetinė dalelė pranykdavo iš stebėjimo lauko. Laikai tarp grandinių kirpimo buvo išanalizuoti ir rezultatai pateikti (16B paveiksle) (žr. 2.8.3.).

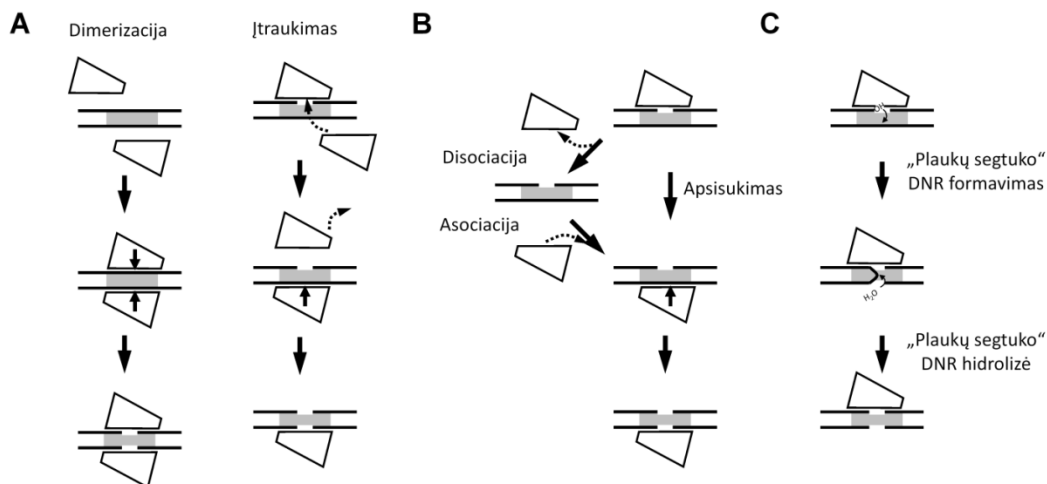
## REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

### 1. Monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandininės DNR hidrolizės mechanizmas.

Tipinės restrikcijos endonukleazės (REazės) yra homodimerai, atpažįstantys palindromines 4-8 bp DNR sekas ir kerpa abi DNR grandines atpažinimo sekoje arba šalia jos. Sąveikos su DNR metu, dimerinės REazės, pasižyminčios dvipuse simetrija, iš kiekvieno subvieneto orientuoja aktyviuosius centrus ties kerpamąja DNR grandine ir įgalina abiejų DNR grandinių kirpimą vienu metu. (Kelly and Smith, 1970). Dauguma II tipo restrikcijos endonukleazių priklauso PD-(D/E)XK aminorūgščių aktyvaus centro motyvo nukleazių superšeimai. Aktyvus centras išsidėsto ant konservatyvios šerdies, sudarytos iš 5  $\beta$ -klosčių lakšto ir 2  $\alpha$ -spiralų (Pingoud et al., 2005).

Nustačius BcnI-DNR komplekso struktūrą paaiškėjo, kad BcnI yra asimetriškai su DNR sąveikaujantis monomeras, kuris sudaro specifinius kontaktus su kiekvienu atpažinimo sekos nukleotidu. Dėl oligomerinės būsenos ir asimetrinės sąveikos, BcnI su savo atpažinimo seka sudaro kompleksus dviem orientacijomis: išdėstydamas aktyvų centrą ties grandine su centriniu 'C' nukleotidu (5'-CCCGG-3', PDB ID 2ODI) (8B paveikslas), arba sudaro kompleksą priešinga orientacija ir išdėsto aktyvų centrą ties grandine su centriniu 'G' nukleotidu (5'-CCGGG-3', PDB ID 3IMB) (8C paveikslas). BcnI yra „pasagos“ formos, todėl sąveikaudamas su DNR, apgaubia dvigrandininę spiralę, atpažįsta specifinę seką iš didžiojo DNR griovio pusės ir hidrolizuoja iš mažojo griovio pusės.

Dėl monomerinės BcnI būsenos ir asimetrinės sąveikos su DNR, galimi keli dvigrandininės DNR hidrolizės mechanizmai (2 paveikslas). Baltymo laikinoji dimerizacija ant specifinio DNR taikinio atpažinimo ir hidrolizės metu yra negalima, dėl struktūrinių BcnI ypatybių sukeltų sterinių trikdžių ir konkurencijos sudarant specifines jungtis su atpažinimo seka (2A paveikslas, „Dimerizacijos“ mechanizmas)., tačiau antrojo monomero įtraukimas po pirmosios DNR grandinės hidrolizės, kuris išstumtų pirmąjį monomerą, yra galimas (2A paveikslas, „Įtraukimo“ mechanizmas). BcnI dvigrandininį DNR trūkį galėtų įvesti dvejomis atskiriomis nikavimo reakcijomis: po pirmosios DNR grandinės hidrolizės, BcnI galėtų pakeisti orientaciją ant DNR apsisukant arba disociacijos-reasociacijos būdu ir hidrolizuoti antrąją DNR grandinę (2B paveikslas). Dviejų DNR grandinių hidrolizė taip pat gali būti atliktą per DNR „plaukų segtuko“ formos tarpinę būseną (2C paveikslas). Galimam BcnI dvigrandininės DNR hidrolizės reakcijos mechanizmui nustatyti buvo atliktos „vienos apsukos“ ir „stacionariosios“ kinetinės reakcijos.

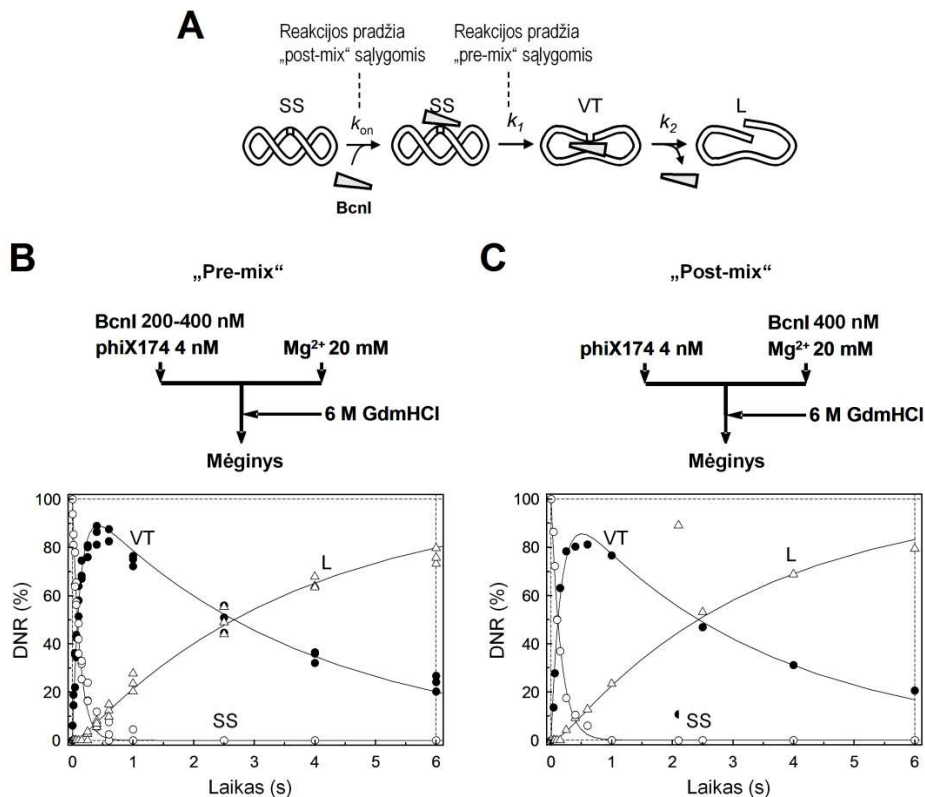


**2 paveikslas. Galimi monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandininės DNR hidrolizės mechanizmai.** Baltymas pažymėtas keturkampe figūra, DNR pažymėta dvejomis lygiagrečiomis juodomis linijomis, BcnI specifinė atpažinimo seka pažymėta pilku stačiakampiu. (A) Baltymas gali sudaryti laikiną dimerą arba įtraukti antrąjį monomerą iš tirpalo, kuris nustumia pirmąjį monomerą ir sudaro kompleksą su DNR priešinga orientacija. (B) „Nuoseklusis mechanizmas“: po pirmosios DNR grandinės hidrolizės, baltymas keičia orientaciją apsisukant arba disociacijos-reasociacijos būdu ir hidrolizuoja antrąją DNR grandinę. (C) Abi DNR grandinės hidrolizuojamos vienu aktyviu centru per „plaukų segtuko“ tarpinę būseną.

### 1.1. „Vienos apsuokos“ BcnI reakcijos ant superspiralizuoto DNR substrato.

Dvigrandininės DNR hidrolizė su BcnI buvo atliekama naudojant superspiralizuotą žiedinę fago phiX174 RFL dvigrandininę 5386bp DNR turinčią vieną BcnI 5'-CCSGG-3' atpažinimo seką. Po pirmosios grandinės hidrolizės, superspiralizuota (SS) DNR buvo paverčiama į viengrandininę trūkį (VT) turinčią formą, o po antrosios grandinės hidrolizės susidarydavo linijinė (L) DNR (3A paveikslas); SS, VT ir L formos buvo atskiriamos agarozinės elektroforezės nedenatūruojančiomis sąlygomis ir įvertinus susidariusių DNR formų kiekius, paskaičiuoti reakcijų greičiai (žr. Tyrimų metodika). „Vienos apsuokos“ sąlygomis atliekamos reakcijos, naudojant didelį fermento perteklių prieš substratą, parodo susijungusio su DNR fermento būseną reakcijos metu. Šio tipo reakcijos buvo atliekamos dviem būdais: (i) „pre-mix“ sąlygomis DNR buvo preinkubuota su BcnI ir reakcija pradeda su  $Mg^{2+}$  jonais, (3B paveikslas, diagrama); (ii) „post-mix“ sąlygomis reakcija pradeda sumaišius BcnI ir DNA+ $Mg^{2+}$  tirpalus (3C paveikslas, diagrama). Atliekant reakcijas „pre-mix“ sąlygomis, eliminuojamas BcnI-DNR komplekso susidarymo etapas ir matuojamas tikrasis DNR hidrolizės greitis. Atlikus reakcijas „pre-mix“ sąlygomis su 100 nM ir 200 nM BcnI, gavome identiškus DNR hidrolizės profilius (3B paveikslas), tuo įrodydami, kad BcnI-DNR komplekso susidarymas nėra limituojanti pirmosios DNR grandinės hidrolizės stadija. Išanalizuoti duomenys rodo, kad BcnI greitai hidrolizuoja

pirmąją taikinio DNR grandinę ( $k_1 \approx 8.3 \text{ s}^{-1}$ ) ir lėtai hidrolizuoja antrąją DNR grandinę ( $k_2 \approx 0.3 \text{ s}^{-1}$ ) (3B paveikslas).



### 3 paveikslas. „Vienos apsuks“ BcnI reakcijos su superspiralizuotu DNR substratu. (A)

Spėjamas dvigrandinės DNR hidrolizės reakcijos mechanizmas: Baltymas sudaro kompleksą (asociacijos greičio konstanta  $k_{on}$ ) su superspiralizuota (SS) DNR, hidrolizuoja pirmąją specifinio taikinio grandinę (hidrolizės greičio konstanta  $k_1$ ) ir SS yra paverčiama į DNR su viengrandiniu trūkiu (VT). Po to BcnI turi pakeisti orientaciją ant DNR ir hidrolizuoti antrąją specifinio taikinio DNR grandinę (hidrolizės greičio konstanta  $k_2$ ). Po antrosios hidrolizės reakcijos susidaro linijinė DNR (L). Visos reakcijos stadijos, vedančios į antrosios DNR grandinės hidrolizę, aprašomos hidrolizės greičio konstanta  $k_2$ . „Vienos apsuks“ reakcijos buvo atliekamos dviem būdais: (i) „pre-mix“ reakcijos sąlygomis DNR buvo preinkubuota su BcnI ir reakcija pradeda su  $\text{Mg}^{2+}$  jonais; (ii) „post-mix“ sąlygomis, reakcija pradeda sumaišius BcnI ir DNA+ $\text{Mg}^{2+}$  tirpalus. Atliekant reakcijas „pre-mix“ sąlygomis, eliminuojamas BcnI-DNR komplekso susidarymo etapas ir matuojamas tikrasis DNR hidrolizės greitis. (B-C) Superspiralizuotos phiX174 DNR hidrolizė restrikcijos endonukleaze BcnI atitinkamai „pre-mix“ ir „post-mix“ sąlygomis. Schemos virš grafikų nurodo atitinkamų eksperimentų eigas. Visos DNR formos susidarantių reakcijos metu, nurodytos grafikuose: superspiralizuota DNR (SS) pažymėta tuščiaviduriais apskritimais, DNR su viengrandiniu trūkiu (VT) pažymėta pilnaviduriais apskritimais o linijinė DNR (L) – tuščiaviduriais trikampaiais. Ištinės linijos grafikuose yra pritaikytos funkcijos pagal schemą (A), kurių pagalba paskaičiuotos pirmosios ir antrosios DNR grandinės hidrolizės konstantos „pre-mix“ ( $k_1=8.3\pm 0.2 \text{ s}^{-1}$  ir  $k_2=0.27\pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ ) ir „post-mix“ ( $k_1=6.2\pm 0.2 \text{ s}^{-1}$  and  $k_2=0.30\pm 0.01 \text{ s}^{-1}$ ) sąlygomis.

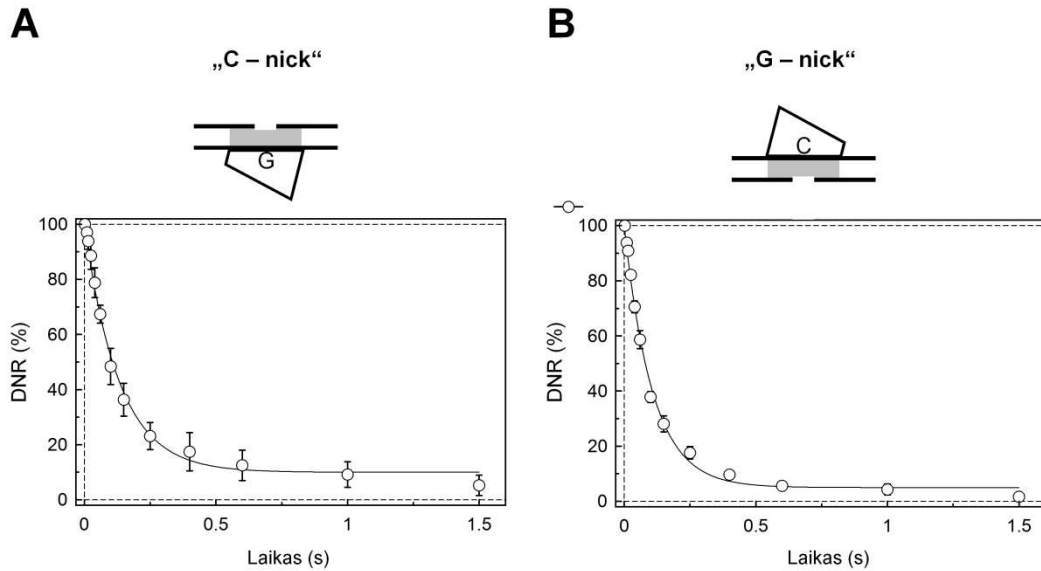


„Post-mix” reakcijos sąlygomis BcnI taip pat greitai hidrolizuoja pirmąją taikinio DNR grandinę ( $k_1 \approx 6.2 \text{ s}^{-1}$ ) ir lėtai hidrolizuoja antrąją DNR grandinę ( $k_2 \approx 0.3 \text{ s}^{-1}$ ) (3C paveikslas). Dėl panašių atitinkamų DNR grandinių hidrolizės konstantų „pre-mix” ir „post-mix” sąlygomis, galima teigti, kad esant 200 nM BcnI koncentracijai, BcnI-DNR komplekso susidarymas yra greitesnis už pirmosios DNR grandinės hidrolizės greitį ( $k_1 \approx 6 \text{ s}^{-1}$ ). Lėčiausia galima bimolekulinio BcnI-DNR komplekso susidarymo konstanta lygi  $k_{ON}/[DNR] = 6 \text{ s}^{-1}/2 \times 10^{-7} \text{ M} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ( $k_{ON}[DNR]/[BcnI] = k_1[DNR]$ ), lėtesnis komplekso susidarymas būtų limituojanti pirmosios DNR grandinės hidrolizės.

Didelė DNR su viengrandiniu trūkiu (VT) išeiga (iki 90 %) reakcijos eigoje ir reakcijos greičių santykis  $k_1/k_2 > 20$ , gautas „vienos apskukos” sąlygomis, parodo kad pirmosios ir antrosios DNR grandinių hidrolizė nėra ekvivalenčios. Gauti duomenys suderinami su „Nuosekliuoju mechanizmu” (2B paveikslas). Taip pat negalime atmesti antros DNR grandinės hidrolizės mechanizmo per „plaukų segtuko” formos tarpinę būseną (2C paveikslas), kurios negalime detektuoti atliekant eksperimentus su žiedine dvigrandinine phiX174 DNR, nes linijinės (L) formos judrumas agaroziniame gelyje turėtų sutapti su phiX174 DNR forma. Atlikus eksperimentus „vienos apskukos” sąlygomis su [ $\gamma$ - $^{33}\text{P}$ ]-ATP 5'-žymėtais oligonukleotidais, „plaukų segtuko” formos DNR nebuvo detekuota. Eksperimentai su oligonukleotidais taip pat parodė, kad 70-80 % BcnI molekulių pirmoji hidrolizuojama specifinio DNR taikinio grandinė turi G nukleotidą centrinėje pozicijoje (5'-CCGGG-3').

## 1.2. „Vienos apskukos” BcnI reakcijos ant viengrandininį trūkį turinčių oligodupleksų.

Ankstesni eksperimentai parodė, kad BcnI specifinio taikinio (5'-CCSGG-3') pirmosios ir antrosios grandinių hidrolizės nėra ekvivalenčios ( $k_1/k_2 > 20$ ) ir gauti duomenys suderinami su „Nuosekliuoju mechanizmu” (2B paveikslas), kurio metu BcnI greitai hidrolizuoja pirmąją DNR taikinio grandinę, keičia orientaciją ant DNR ir lėtai hidrolizuoja antrąją DNR taikinio grandinę (3B-C paveikslas). Galimos dvi specifinio taikinio antrosios DNR grandinės lėtos hidrolizės priežastys: (i) antrosios DNR grandinės hidrolizės greitį riboja lėtas BcnI orientacijos pakeitimas, (ii) BcnI lėčiau hidrolizuoja antrąją DNR grandinę dėl viengrandininio trūkio primijoje grandinėje. Priežasties išaiškinimui, „vienos apskukos” sąlygomis atlikome BcnI kinetinius eksperimentus su viengrandininį trūkį turinčiais oligodupleksais 30 bp G-nick ir 30 bp C-nick, atitinkamai turinčiais viengrandinius trūkius BcnI specifinės sekos grandinėse su centru G ir C nukleotidais. Rezultatai parodė, kad „pre-mix” sąlygomis BcnI hidrolizuoja 30 bp G-nick substrato C grandinę ir 30 bp C-nick substrato G grandinę žymiai greičiau ( $k(C) \approx k(G) \approx 8.5 \text{ s}^{-1}$ ) (4A-B paveikslas) nei superspiralizuotos phiX174 DNR antrąją grandinę ( $k_2 \approx 0.3 \text{ s}^{-1}$ ) (3B-C paveikslas). Eksperimentai įrodo, kad BcnI specifinio taikinio (5'-CCSGG-3') antrosios DNR grandinės hidrolizę limituoja lėtas BcnI orientacijos pakeitimas ant DNR po pirmosios DNR grandinės hidrolizės.

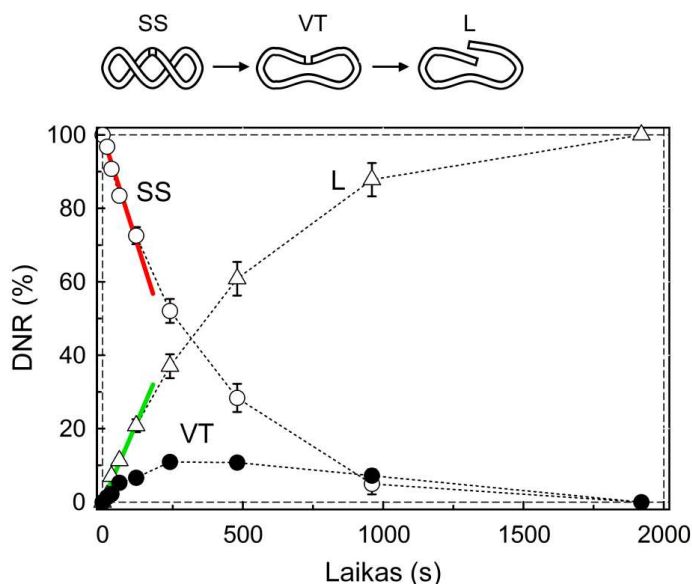


**Paveikslas 4. „Vienos apsukos” BcnI reakcijos ant viengrandininį trūkį turinčių oligodupleksų.** BcnI ir viengrandininį trūkį turinčių oligodupleksų kompleksai pavaizduoti paveikslų viršuje. Reakcijos buvo atliktos „pre-mix” sąlygomis, kurių metu BcnI preinkubuojamas su DNR ir reakcija inicijuojama  $Mg^{2+}$  jonais. Linijos einančios per eksperimentinius DNR substratų kiekio taškus yra vienos eksponentės funkcijos. BcnI C-nick substrato hidrolizės konstanta lygi  $k(G)=7.6\pm 0.3\text{ s}^{-1}$ , G-nick substrato hidrolizės konstanta lygi  $k(C)=9.3\pm 0.3\text{ s}^{-1}$ .

### 1.3. BcnI „stacionariosios” reakcijos su superspiralizuotu DNR substratu

„Stacionariosios” reakcijos parodo viso reakcijos mechanizmo greitį, įskaitant fermento-substrato komplekso susidarymą, substrato hidrolizę ir fermento-produkto disociaciją. Produktai, susidarę „stacionariųjų” reakcijų metu yra disocijavę nuo fermento ir jų santykis gali pasakyti kiek fosfodiesterinių ryšių fermentas hidrolizuoja vienos asociacijos su DNR metu. Jei BcnI hidrolizuotų savo specifinę seką pagal „nuoseklųjį” disociacijos-reasociacijos mechanizmą (2B paveikslas), reakcijos eigoje galėtų susidaryti iki 50% DNR su viengrandiniu trūkiu (VT). Jei BcnI hidrolizuotų savo specifinę seką pagal „nuoseklųjį” mechanizmą apsisukant (2B paveikslas), superspiralizuota DNR būtų tiesiogiai paverčiama linijine DNR (L).

„Stacionariosios” reakcijos buvo atliekamos su 0.1 nM BcnI ir dideliu phiX174 DNR pertekliumi (1-2 nM, abi koncentracijos didesnės už  $K_M$ ), reakcija inicijuojama  $Mg^{2+}$  jonais. Iš gautų duomenų nustatyta visos reakcijos katalitinė konstanta ( $k_{cat}=0.05\text{ s}^{-1}$ ), taip pat pastebėta, kad reakcijos metu susidaro tik 10% VT DNR (arba 25% visų produktų) (5 paveikslas). VT DNR formos susidarymas „stacionariosiomis” reakcijos sąlygomis yra nesuderinamas su „Itraukimo” mechanizmu (2A paveikslas), o dėl žemos BcnI koncentracijos ir  $[BcnI] \ll [DNA]$  sąlygų BcnI „dimerizacija” negalima (2A paveikslas). Efektyvus linijinės (L) DNR susidarymas yra suderinamas su „nuosekliuoju” mechanizmu apsisukant (2B paveikslas).



**5 paveikslas. BcnI „stacionariosios” reakcijos su superspiralizuotu DNR substratu.** Schema virš grafiko parodo visas DNR formas, galinčias susidaryti phiX174 DNA hidrolizės reakcijos metu su BcnI. Reakcijos buvo atliekamos su 2 nM DNA ir 0.1 nM BcnI. Raudona linija yra pritaikyta linijinė funkcija, atitinkanti superspiralizuotos DNR (SS) hidrolizės greitį  $0.0048 \pm 0.0003$  nM/s ( $k_{cat} = 0.048 \pm 0.003$  s<sup>-1</sup>) pradinuose reakcijos taškuose ( $[E] \ll [S]$ ). Žalia linija yra pritaikyta linijinė funkcija, atitinkanti linijinės (L) DNR susidarymo greitį  $0.0036 \pm 0.0015$  nM/s ( $k_{cat} = 0.036 \pm 0.015$  s<sup>-1</sup>) pradinuose reakcijos taškuose ( $[E] \ll [S]$ ). Linijinės DNR susidarymo ir superspiralizuotos DNR hidrolizės santykis ( $0.0036/0.0048$ ) rodo, kad BcnI ~75% pradinio substrato (SS) tiesiogiai konvertuoja į galutinį produktą (L).

Jeigu BcnI keičia orientaciją ant DNR „nuosekliuoju apsisukimo” mechanizmu, po pirmosios specifinės sekos grandinės hidrolizės, BcnI per struktūrinę linkį (Sokolowska et al., 2007) privalo atidaryti BcnI struktūrą, nedisocijuodamas apsisukti apie DNR 180° laipsnių ir užsidarius BcnI struktūrai atpažinti komplementarios grandinės atpažinimo seką.

#### 1.4. Eksperimentai su DNR ir baltymo „gaidyklėmis”.

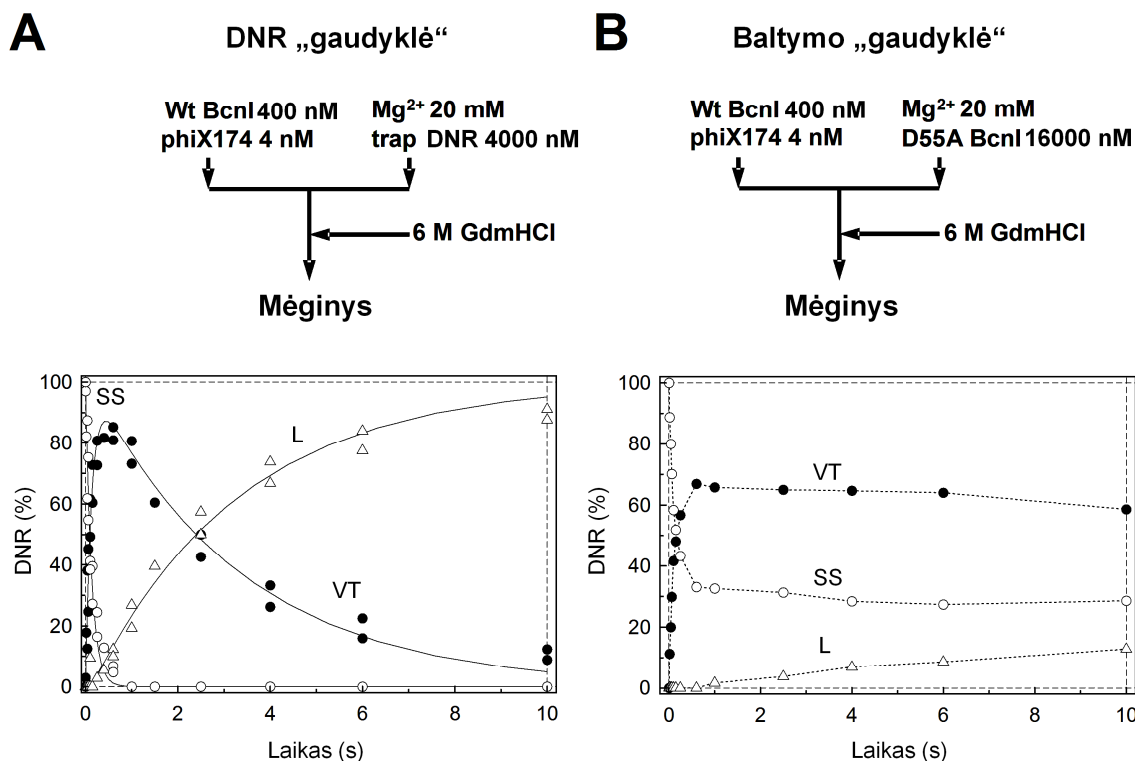
Norėdami nustatyti tiesioginio BcnI apsisukimo ant DNR po pirmosios grandinės hidrolizės pobūdį, atlikome DNR ir baltymo „gaidyklės” kinetinius eksperimentus. Eksperimentai buvo atliekami „vienos apsukos” „pre-mix” sąlygomis reakciją inicijuojant 10 mM Mg<sup>2+</sup> ir specifinio oligoduplekso „TRAP“ pertekliumi (galutinės koncentracijos: 2 nM phiX174, 200 nM BcnI(wt) ir 2000 nM oligoduplekso „TRAP“) (6A paveikslas) arba 10 mM Mg<sup>2+</sup> ir katalitiškai neaktyvaus, bet efektyviai atpažįstančio specifinę seką mutanto BcnI(D55A) dideliu pertekliumi (galutinės koncentracijos: 2 nM phiX174, 200 nM BcnI(wt) ir 8000 nM BcnI(D55A)) (6B paveikslas). Jei DNR „gaidyklės“ reakcijos sąlygomis BcnI nebus sudaręs kompleksą su DNR arba disocijuos po pirmosios grandinės hidrolizės, laisvas BcnI iš karto sudarys kompleksą su nežymėto specifinio oligoduplekso



pertekliumi ir phiX174 DNR antrosios grandinės hidrolizė bus sustabdyta arba sulėtės. Kontrolinis eksperimentas, pradėtas sumaišius BcnI su phiX174 ir „TRAP“ oligoduplekso mišiniu, rodo žymiai lėtesnę phiX174 hidrolizę lyginant su phiX174 hidrolize be „TRAP“ oligoduplekso ir įrodo eksperimento efektyvumą. Tačiau eksperimentai parodė, kad BcnI yra atsparus DNR „gaudyklei“, BcnI greitai hidrolizavo pirmąją DNR taikinio grandinę ( $k_1=7.5\pm 0.3\text{ s}^{-1}$ ) ir lėtai antrąją grandinę ( $k_2=0.31\pm 0.01\text{ s}^{-1}$ ) (6A paveikslas), gautos hidrolizės konstantos sutapo su standartinės „vienos apsukos“ hidrolizės konstantomis (3 paveikslas). DNR „gaudyklės“ eksperimentas įrodo, kad BcnI geba abi specifinio taikinio grandinės hidrolizuoti be disociacijos, ir eksperimento metu visa phiX174 DNR yra komplekse su BcnI, o jo disociacija yra žymiai lėtesnė už pirmosios grandinės hidrolizę.

Baltymo „gaudyklės“ eksperimente BcnI greitai hidrolizavo primąją DNR grandinę, bet po to reakcija beveik sustoja (6B paveikslas). Abu „gaudyklės“ eksperimentai parodo, kad po pirmosios DNR grandinės hidrolizės BcnI nedisocijuodamas atidengia specifinę seką, pakeičia orientaciją ant DNR ir hidrolizuoja antrąją atpažinimo sekos grandinę. Sekos atidengimas reakcijos eigoje prieštarauja hidrolizės mechanizmui per „plaukų segtuko“ formos tarpinę būseną (2C paveikslas).

BcnI po pirmosios DNR grandinės hidrolizės gali atidengti specifinę seką dėl baltymo Brown'o judėjimo išilgai DNR, vadinamo „šliaužiojimu“ (angl. 'sliding'), o dėl mikroskopinių disociacijos-reasociacijos ciklų ant tos pačios DNR (vadinamų „šokčiojimais“, angl. 'hopping') BcnI gali pakeisti orientaciją ant DNR, „šliaužiojimo“ būdu grįžti ir hidrolizuoti antrąją DNR grandinę (Gowers et al., 2005; Halford, 2004).



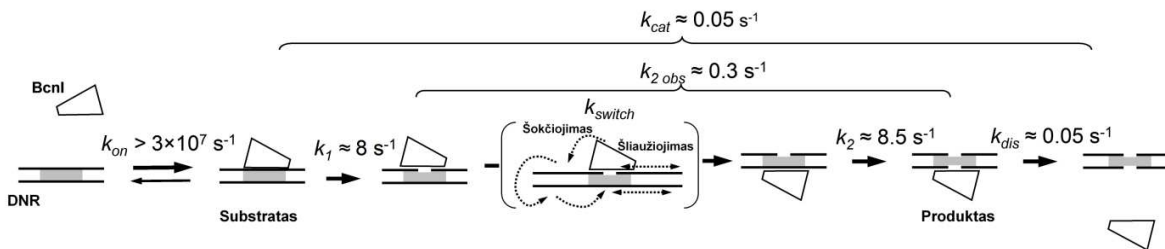
**6 paveikslas. „Gaudyklės” eksperimentai.** Trijų phiX174 DNR formų kiekiai atidėti abiejuose grafikuose: superspiralizuota DNR (SS) pažymėta tuščiaiduriais apskritimais, DNR su viengrandiniu trūkiu (VT) pažymėta pilnaviduriais apskritimais o linijinė DNR (L) – tuščiaiduriais trikampaiais. (A) Kinetiniai „pre-mix” eksperimentai su DNR „gaudyklė”. Schema virš grafiko nurodo eksperimento, atlikto sustabdytos tėkmės prietaisu, eigą. BcnI buvo preinkubuotas su phiX174 DNR, reakcija pradėta Mg-acetatu ir „TRAP” oligodupleksu (Lentelė 1). DNR oligodupleksas VT DNR susidarymui ir hidrolizei įtakos neturėjo. Tai rodo, kad po pirmosios DNR grandinės hidrolizės, BcnI keičia orientaciją ant DNR be disociacijos. Apskaičiuotos pirmosios ir antrosios DNR grandinės hidrolizės konstantos yra  $k_1=7.5\pm 0.3\text{ s}^{-1}$  ir  $k_2=0.31\pm 0.01\text{ s}^{-1}$ . (B) Kinetiniai „post-mix” eksperimentai su baltymo gaudykle. BcnI buvo preinkubuotas su phiX174 DNR, reakcija pradėta Mg-acetatu ir neaktyvaus BcnI(D55A) mutanto pertekliumi. Mutantinis baltymas inhibavo VT DNR hidrolizę. Eksperimentas rodo, kad po pirmosios DNR grandinės hidrolizės, BcnI palieka specifinę seką, todėl neaktyvus mutantus gali su taikiniu sudaryti kompleksą.

### 1.5. Monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmas.

Kinetiniai eksperimentai skirtingomis sąlygomis padėjo išaiškinti, kad dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmas restrikcijos endonukleaze BcnI skirstomas į 5 stadijas (7 paveikslas): (i) BcnI asociaciją su DNR substratu; (ii) pirmosios DNR grandinės hidrolizę; (iii) BcnI orientacijos pakeitimą ant DNR; (iv) antrosios DNR grandinės hidrolizę; ir (v) produkto disociaciją.

Vienos hidrolizės konstantos gautos atlikus „vienos apskukos“ eksperimentus „pre-mix“ ir „post-mix“ sąlygomis rodo, kad BcnI-DNR komplekso susidarymas nelimituoja pirmosios DNR grandinės hidrolizės (3A-B paveikslas). Nustatyta BcnI-DNR komplekso susidarymo konstantos žemiausia riba  $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  yra panaši į kitų REazių-DNR kompleksų susidarymo konstantas (Laurens et al., 2009; Zaremba et al., 2010) ir yra artima difuzijos abribotai maksimaliai kompleksų susidarymo konstantai (Halford and Marko, 2004). Susidarius BcnI-DNR kompleksui, BcnI greitai hidrolizuoja primąją specifinio taikinio DNR grandinę ( $k_1 \approx 8 \text{ s}^{-1}$ ), tačiau lėtai hidrolizuoja antrąją DNR grandinę ( $k_2 \approx 0.3 \text{ s}^{-1}$ ) (3B-C paveikslas). Eksperimentai su viengrandininį trūkį turinčiais substratais parodė, kad BcnI antrąją DNR grandinę hidrolizuoja taip pat greitai kaip ir pirmąją ( $k(C) \approx k(G) \approx 8.5 \text{ s}^{-1}$ , 4A-B paveikslas), o limituojanti antrosios DNR grandinės hidrolizės stadija yra BcnI orientacijos keitimas ant DNR. DNR ir baltymo „gaudyklės“ eksperimentai įrodė, kad BcnI orientacijos pakeitimas ant DNR vyksta be disociacijos į tirpalą, bet atidengiant specifinę seką (6A-B paveikslas). BcnI orientacijos pakeitimas ant DNR be disociacijos į tirpalą taip pat patvirtintas „stacionariosiomis“ reakcijomis, kurių metu tik 25 % produktų buvo viengrandininį trūkį turinti DNR forma, o pagrindinis tiesiogiai iš superspiralizuotos DNR (SS) susidarantis produktas buvo linijinė DNR (5 paveikslas). Kitos restrikcijos endonukleazės specifinį DNR taikinį suranda „palengvintosios difuzijos“ būdu, „šliaužiodamos“ ir „šokčiodamos“ ant DNR (Bellamy et al., 2005; Gowers and Halford, 2003; Stanford, 2000). Tikėtina, kad BcnI šį mechanizmą naudoja, ne tik specifinio taikinio suradimui, bet ir orientacijos pakeitimui ant DNR.

Kaip ir daugelio restrikcijos endonukleazių (Sapranauskas et al., 2000; Sasnauskas et al., 1999; Wright et al., 1999), BcnI reakcijos mechanizmo limituojanti stadija yra produkto disociacija nuo BcnI ( $k_{cat} \approx 0.05 \text{ s}^{-1}$ , 6 paveikslas).



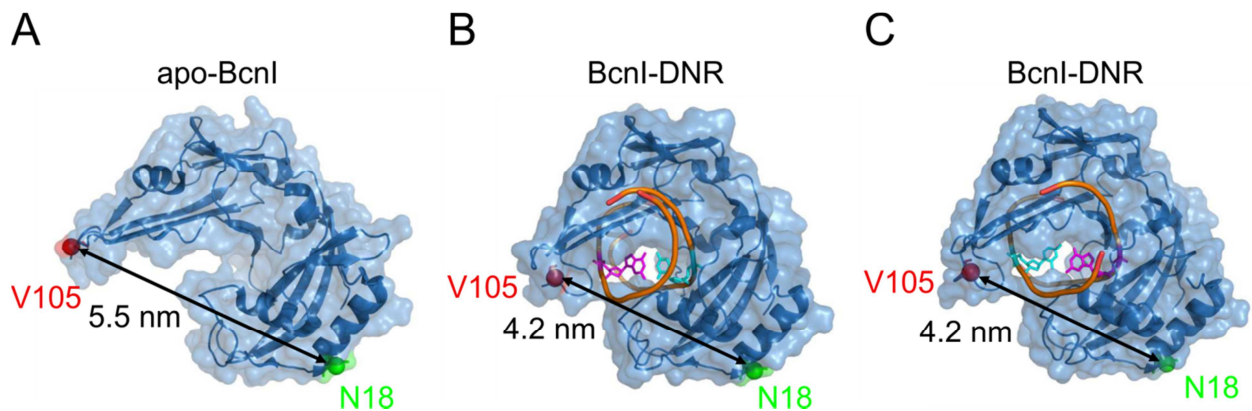
**7 paveikslas. Monomerinės restrikcijos endonukleazės BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmas.** BcnI greitai sudaro kompleksą su savo atpažinimo seka (greičio konstanta  $k_{on}$ ); po to greitai hidrolizuoja pirmąją DNR grandinę ir susidaro DNR su viengrandininium trūkium (VT). Antrosios DNR grandinės hidrolizė yra lėta (greičio konstanta  $k_2$ ) ir susideda iš dviejų procesų: (i) santykinai lėto BcnI orientacijos pakeitimo ant DNR (greičio konstanta  $k_{switch}$ ), apimančio BcnI disociaciją nuo specifinio taikinio ir (ii) greitos hidrolizės ( $k(C)$  arba  $k(G)$ ). Reakcija yra užbaigiama produkto disociacija ( $k_{dis}$ ), kuri riboja viso reakcijos ciklo greitį ( $k_{cat}$ ). Galima BcnI disociacija nuo DNR po pirmosios grandinės hidrolizės (atitinka ~ 25% visų BcnI reakcijų su phiX174 DNA) schemoje neparodyta.

## 2. Pavienių molekulių eksperimentai

Įvairūs kinetiniai eksperimentai padėjo nustatyti, kad monomerinė restrikcijos endonukleazė BcnI po pirmosios specifinio taikinio DNR grandinės hidrolizės keičia orientaciją ant DNR be disociacijos į tirpalą, tačiau atidengia specifinį taikinį. BcnI-DNR komplekso struktūriniai duomenys rodo, kad BcnI orientacijos keitimui ant DNR yra būtinas  $180^\circ$  apsisukimas, kuris negalėtų vykti be BcnI pasagos formos struktūros atsiskyrimo (Sokolowska et al., 2007). Padarytos išvados leido iškelti hipotezę, kad BcnI po pirmosios specifinio taikinio DNR grandinės hidrolizės, orientacijos keitimui naudoja „palengvintosios difuzijos“ mechanizmą (Halford, 2004), bei keičia konformaciją. Iškeltai hipotezei patikrinti, atlikome fluorescencijos ir jėgos spektroskopijos pavienių molekulių eksperimentus, leidžiančius stebėti pavienių baltymo molekulių vienmatę difuziją ant DNR, nustatyti baltymo struktūros konformaciją ir sąveikos su specifine DNR orientaciją.

### 2.1. Apo-BcnI ir BcnI-DNR kompleksų struktūrų palyginimas.

Nustatytos BcnI-DNR kompleksų struktūros parodo, kad BcnI sudavo specifinius kontaktus su kiekvienu atpažinimo sekos (5'-CCSGG-3') nukleotidu ir priklausomai nuo susidariusio komplekso, orientuoja aktyvų centrą ties atpažinimo sekos grandine su centriniu C (5'-CCCGG-3', PDB ID 2ODI) arba ties grandine su centriniu G (5'-CCGGG-3', PDB ID 3IMB) nukleotidais. Struktūriniai duomenys rodo, kad apo-BcnI struktūros atpažinimo ir katalitiniai subdomenai yra labiau nutolę vienas nuo kito (5'-CCGGG-3', PDB ID 2ODH), lyginant su baltymu, sąveikaujančiu su specifine DNR (5'-CCGGG-3', PDB ID 2ODI) (8 paveikslas).



**8 paveikslas. apo-BcnI ir BcnI-DNR kompleksų struktūros.** (A) Apo-BcnI (PDB ID 2ODH) ir BcnI-DNR kompleksų struktūros, kuriose BcnI orientuoja aktyvų centrą ties atpažinimo sekos (5'-CCSGG-3') (B) „C“ (PDB ID: 2ODI) arba (C) „G“ (PDB ID: 3IMB) grandinėmis. Žalios ir raudonos sferos žymi C $\beta$  atomus N18 ir V105 aminorūgščių, kurios buvo išmutuotos į cisteinus ir pažymėtos fluorescentiniais dažais. Atstumai tarp N18 ir V105 aminorūgščių C $\beta$  atomų yra 5.51 nm ‘atviroje’ (PDB ID 2ODH) ir 4.2 nm ‘uždaroje’ (PDB ID 2ODI, 3IMB) konformacijose. BcnI specifinės atpažinimo sekos C ir G nukleotidai pažymėti žydra ir violetine spalvomis.

## 2.2. BcnI žymėjimo pozicijų nustatymas.

BcnI konformacijų nustatymui tirpale, atlikome pavienių molekulių FRET eksperimentus konfokaliniu mikroskopu. Eksperimentams buvo naudojamas dviem fluoroforais (Alexa488, Alexa546) atpažinimo ir katalitiniame subdomenuose pažymėtas BcnI baltymas. Pažymėjimo pozicijos parinktos matuojant atstumą tarp atpažinimo ir katalitinio subdomenų aminorūgščių C $\beta$  atomų, kuris turi būti artimas Alexa488-Alexa546 fluorescentinių dažų poros Fiorsterio spinduliui ( $R_0=6.4$  nm), o atstumo pokytis tarp šių aminorūgščių, lyginant 'atvirą' apo-BcnI (PDB ID 2ODH) ir 'uždara' BcnI-DNR (PDB ID 2ODI) komplekso struktūras (8A-B paveikslas), turi būti pakankamai žymus, kad eksperimentų metu keičiantis BcnI konformacijai stebėtume žymų FRET pokytį. Geriausiai šias sąlygas atitiko N18 ir V105 aminorūgštys, atstumai tarp kurių yra 5.51 nm atviroje' ir 4.2 nm 'uždaroje' konformacijose.

BcnI sąveikos su DNR orientacijos nustatymui, vienu fluoroforu žymėjome BcnI ir DNR. Pozicijos ant BcnI aminorūgščių (N18, V105 ir K209) C $\beta$  atomų ir DNR nukleotidų C5 atomų pozicijų buvo parinktos taip, kad BcnI sąveikaujant su DNR skirtingomis orientacijomis, atstumų pokyčiai būtų didžiausi ir artimi Alexa488-Alexa546 fluorescentinių dažų poros Fiorsterio spinduliui ( $R_0=6.4$  nm). DNR 14 pozicija 3'-5' kryptimi nuo centrinio atpažinimo sekos nukleotido (5'-CCSGG-3') ir BcnI N18, V105 ir K209 pozicijos buvo parinktos remiantis 2ODI and 3IMB struktūromis (8 paveikslas). Atitinkami, sukonstruoti BcnI cisteininiai mutantai ir paskaičiuotos FRET efektyvumo išeigos ( $E_{FRET}$ ), BcnI su DNR sąveikaujant skirtingomis orientacijomis, yra pateiktos 14 paveiksle.

## 2.3. BcnI cisteininių mutantų konstravimas, gryninimas ir charakterizavimas.

Specifinis baltymų pažymėjimas fluorescentiniais dažais vyksta fluoroforo maleimidui reaguojant su baltymo cisteinu, įvestu specifinėje pozicijoje. Nepageidaujama žymėjimo pozicija buvo pašalinta naturalų BcnI cisteiną išmutavus į alaniną ir seriną. Išgryninti BcnI(C202A) ir BcnI(C202S) baltymai su savo specifine DNR seka sąveikavo taip pat specifiškai kaip ir laukinio tipo baltymas. BcnI kinetiniai eksperimentai stacionariosiomis sąlygomis su dvigrandinine superspiralizuota phiX174 DNR rodo, kad BcnI(C202A) reakcijos metu į tirpalą paleidžia iki 20 % produkto su viengrandiniu trūkiu (VT). Tikslinių cisteinų mutacijų įvedimui pasirinktas BcnI(C202S), kuris kaip ir BcnI(wt) į tirpalą paleidžia tik iki 10% produkto su viengrandiniu trūkiu (VT).

Pasirinktos žymėjimo pozicijų aminorūgštys (N18, V105 ir K209) buvo pakeistos į cisteinus kryptingosios mutagenezės būdu. Sukonstruoti BcnI(N18+C202S), BcnI(V105C+C202S), BcnI(C202S+K209C) ir BcnI(N18+V105C+C202S) mutantiniai baltymai buvo ekspresuoti ir išgryninti kaip aprašyta metoduose. Stacionarūs kinetiniai eksperimentai su dvigrandinine superspiralizuota phiX174 DNR rodo, kad BcnI cisteininiai mutantai išlaiko 52-74 % BcnI(wt) aktyvumo (Lentelė 2). BcnI ir specifinės DNR sąveikos eksperimentai rodo, kad įvestos mutacijos, sąveikos afiniškumui nepakenkė (Lentelė 2).

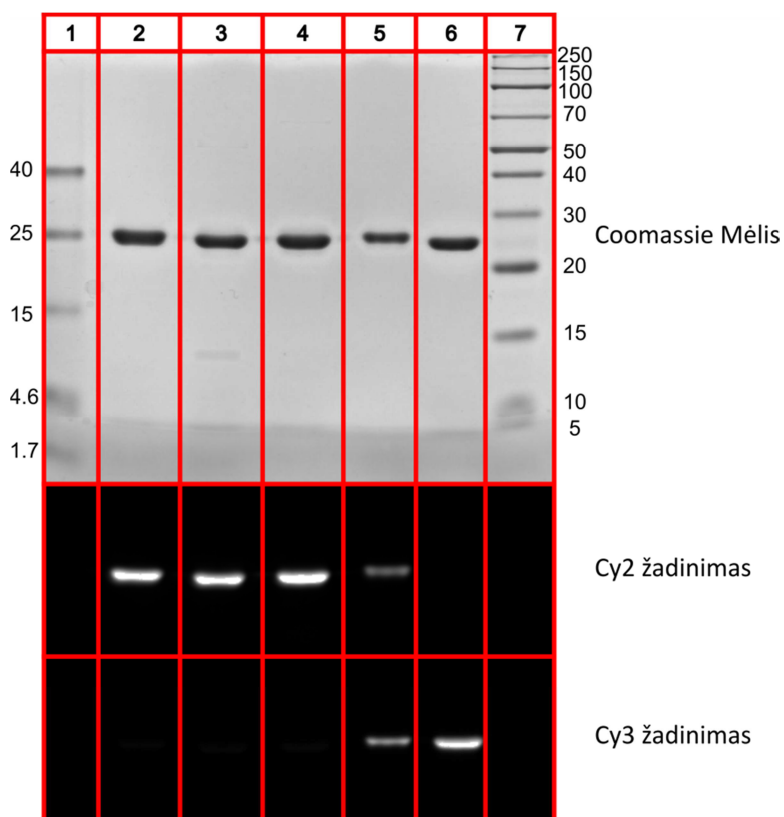


**Lentelė 2. BcnI sąveikos su specifine DNR disociacijos konstantos ( $k_D$ ) ir katalitinio aktyvumo konstantos ( $k_{cat}$ ) stacionariosiomis sąlygomis.**

BcnI konjugatas	$k_D(\text{nM}) \pm St.$ <i>paklaida</i>	$k_{cat}(\text{s}^{-1}) \pm St.$ <i>paklaida</i>	$k_{cat}, \text{s}^{-1}$ (BcnI protein)/ $k_{cat}, \text{s}^{-1}$ (BcnI (wt)), %
BcnI(wt)	0.21±0.050	0.042±0.0017	100
BcnI(C202A)	0.2±0.038	0.037±0.0015	88
BcnI(C202S)	0.29±0.045	0.036±0.0035	86
BcnI(N18C+C202S)	0.29±0.065	0.022±0.0015	52
BcnI(N18C+C202S)-Alexa488	0.18±0.037	0.013±0.0012	31
BcnI(V105C+C202S)	0.15±0.041	0.026±0.0032	62
BcnI(V105C+C202S)-Alexa488	0.16±0.037	0.026±0.0013	62
BcnI(V105C+C202S)-Biotin	-	0.02±0.0015	48
BcnI(C202S+K209C)	0.18±0.049	0.029±0.0024	69
BcnI(C202S+K209C)-Alexa488	0.44±0.080	0.017±0.0011	40
BcnI(N18C+V105C+C202S)	0.3±0.094	0.031±0.0026	74
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488- Alexa546	-	0.015±0.0012	36

#### 2.4. BcnI žymėjimas fluorescentiniais dažais.

Viengubi ir dvigubi BcnI cisteininiai mutantai buvo pažymėti ir išgryninti pagal anksčiau aprašytas metodikas. Gautų pažymėtų BcnI baltymų koncentracijos bei pažymėjimo laipsniai pateikti Lentelėje 3. Pažymėtų BcnI baltymų grynumas buvo įvertintas, vykdant baltymų elektroforezę poliakrilamidiniame gelyje. Fluoroforų detekcija buvo vykdoma, poliakrilamidinį gelį su išfrakcionuotais pažymėtais BcnI baltymais žadinant Cy2(Alexa488) ir Cy3(Alexa546) žadinimo bangos ilgiais. Vėliau gelis buvo nudažytas Coomassie mėliu (9 paveikslas). Fluorescentiniai signalai persidengė su baltymo pozicijomis gelyje, tuo tarpu laisvų fluoroforų bei papildomų baltymų gelyje nedetektuota. Buvo padaryta išvada, kad pažymėti BcnI baltymai yra be priemaišų ir išvalyti nuo laisvų fluoroforų.



**9 paveikslas. BcnI cisteininių mutantų pažymėjimas fluoroforais.** Pažymėti BcnI baltymai buvo frakcionuojami poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. Gelis buvo žadinamas Cy2(Alexa488) ir Cy3(Alexa546) žadinimo bangos ilgiais ir gelis buvo dažomas Coomassie mėliu. Fluorescentiniai signalai persidengė su baltymo pozicijomis gelyje, tuo tarpu laisvų fluoroforų bei papildomų baltymų gelyje detekuota nebuvo. Buvo padaryta išvada, kad pažymėti BcnI baltymai yra be priemaišų ir pilnai išvalyti nuo laisvų fluoroforų. 1. Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder(26628), 2. BcnI(N18C+C202S)-Alexa488, 3. BcnI(C202S+K209C)-Alexa488, 4. BcnI(V105C+C202S)-Alexa488, 5. BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546, 6. BcnI(N18C+C202S)-Cy3, 7. Page Ruler TM Broad Range (26630). 2  $\mu\text{g}$  kiekvieno viengubai žymėto ir 1  $\mu\text{g}$  dvigubai žymėto BcnI baltymo buvo frakcionuojama poliakrilamidiniame gelyje.

## 2.5. Fiersterio spindulio nustatymas.

Eksperimentiniai Fiersterio spinduliai ( $R_0$ ) buvo nustatyti vienu fluorescentiniu donoru Alexa488 pažymėtiems BcnI baltymams (BcnI(N18C+C202S), BcnI(V105C+C202S) ir BcnI(C202S+K209C)) be arba su 10 mM  $\text{Ca}(\text{OAc})_2$  bei su 10 mM  $\text{Ca}(\text{OAc})_2$  ir 1  $\mu\text{M}$  specifinio oligoduplekso (seka identiška C-DNA-Alexa546 oligodupleksui, bet neturi Alexa546 fluoroforo) pagal aprašytą metodiką (Lentelė 3). Eksperimentiniai Fiersterio spinduliai ( $R_0$ ) buvo panaudoti teorinėms FRET pernašos išėigoms ( $E_{FRET}$ ) paskaičiuoti iš BcnI-DNR struktūrų (PDB ID 2ODI ir 3IMB) atstumų (14 paveikslas).

**Lentelė 3. Fluorescentiškai pažymėtų BcnI baltymų pažymėjimo laipsniai, kvantinės išėigos ( $\phi_D$ ), eksperimentiškai nustatyti Fioersterio spinduliai ( $R_0$ ) ir anizotropijos.**

BcnI konjugatas	Pažymėjimo laipsnis	Sąlygos	$\phi_D$	$R_0$ , nm	Anizotropija
BcnI(N18C+C202S)-Alexa488	75.9% (Alexa488)	-	0.77	6.0	0.134
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	0.75	5.98	0.135
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub> + 1μM SP DNR	0.79	6.04	0.112
BcnI(V105C+C202S)-Alexa488	97% (Alexa488)	-	0.80	6.03	0.190
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	0.75	5.97	0.182
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub> + 1μM SP DNR	0.77	6.01	0.087
BcnI(C202S+K209C)-Alexa488	96.5% (Alexa488)	-	0.64	5.81	0.232
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	0.70	5.90	0.223
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub> + 1μM SP DNR	0.79	6.03	0.092
BcnI(N18C+C202S)-Alexa546	98.2% (Alexa546)	-	-	-	0.231
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	-	-	0.245
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub> + 1μM SP DNR	-	-	0.251
BcnI(V105C+C202S)-Alexa546	100% (Alexa546)	-	-	-	0.248
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	-	-	0.249
		+10mM Ca(OAc) <sub>2</sub> + 1μM SP DNR	-	-	0.215
BcnI(N18C+V105C+C202S)- Alexa488-Alexa546	94.5% (Alexa488) 57.7% (Alexa546)	-	-	-	-

## 2.6. BcnI konformacinės būsenos.

Pavienių molekulių FRET eksperimentai buvo atlikti su laisvai difunduojančiais dvigubai žymėtais BcnI(N18+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546 baltymais, naudojant invertuotą konfokalinį mikroskopą. Eksperimentus atlikome skirtingomis sąlygomis: be DNR, su nespecificine (NSP) DNR, su specifine (SP) DNR, taip pat eksperimentai visomis minėtomis sąlygomis buvo atlikti esant Ca<sup>2+</sup> (10A-C paveikslas). Eksperimentai be DNR ir be Ca<sup>2+</sup> jonų parodė, kad BcnI FRET efektyvumas ( $E_{FRET}$ ) lygus 0.61 ir atitinka teorinę apo-BcnI  $E_{FRET}$  reikšmę ( $E_{FRET}=0.63$ ,  $r=5.51$  nm (Figure 8A),  $R_0=6$  nm (Lentelė 3)).

Platus FRET reikšmių skirstinys ( $\sigma=0.41$ , 10A paveikslas, Lentelė 4) parodo, kad šiose sąlygose BcnI struktūra yra neapibrėžta ir neturi fiksuotos konformacijos. Mažesnių  $E_{FRET}$  reikšmių skirstinio kairysis petys (mažos  $E_{FRET}$  reikšmės) atitinka atvirą konformaciją, kurioje atstumas tarp katalitinio ir atpažinimo subdomenų turėtų būti didesnis nei stebimas apo-BcnI struktūroje (PDB ID 2ODH), o dešinysis skirstinio petys (didelės  $E_{FRET}$  reikšmės)



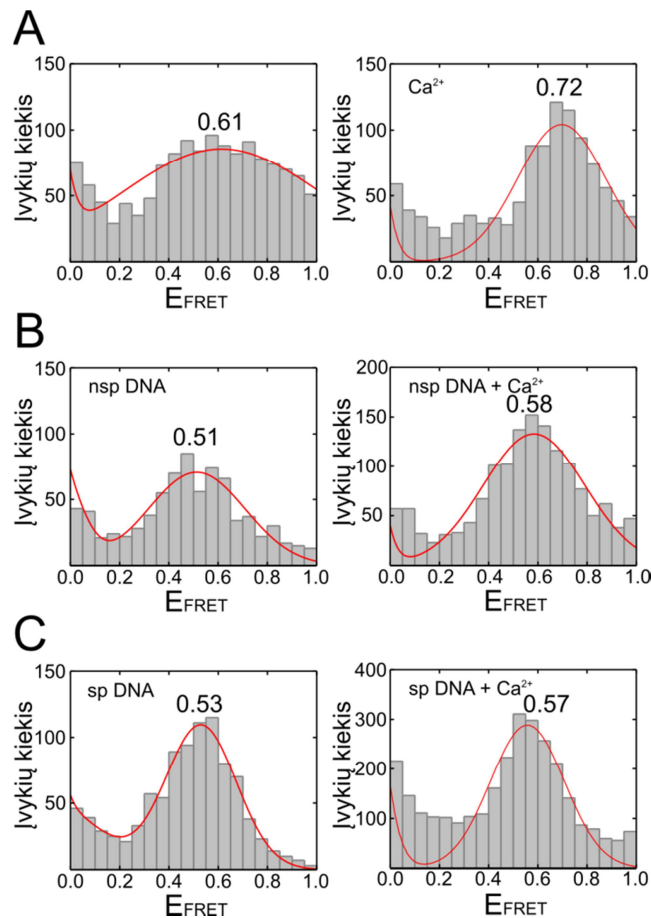
iš dalies atitinka uždara BcnI konformaciją ( $E_{FRET}=0.89$ ,  $r=4.2$  nm (Figure 8B-C),  $R_0=6$  nm (Lentelė 3)), stebimą BcnI-DNR kompleksuose (PDB ID 2ODI ir 3IMB). Eksperimentuose su NSP arba SP DNR yra stebimas siauras  $E_{FRET}$  reikšmių pasiskirstymas ( $\sigma=0.2$ ), apibūdinantis fiksuotą BcnI konformaciją, bet  $E_{FRET}$  reikšmės abiem atvejais yra mažos ir vienodos (0.51-0.53, 10B-C paveikslas). Šie rezultatai yra suderinami su BcnI ir SP/NSP DNR neselektyvia sąveika nesant  $Ca^{2+}$  jonų ( $K_d(\text{BcnI-DNR}_{NSP})=870$  nM,  $K_d(\text{BcnI-DNR}_{SP})=540$  nM, “Baltymo ir DNR sąveikos tyrimas elektroforetinio judrumo poslinkio metodu”, nepublikuoti duomenys). Tirpale su SP DNR, NSP DNR ir  $Ca^{2+}$  jonais, BcnI formuoja labiau uždara kompleksą, nei be  $Ca^{2+}$  jonų ( $E_{FRET}=0.57$ , 10B-C paveikslas), tačiau su SP DNR  $E_{FRET}$  reikšmių skirstinys yra siauresnis, nei su NSP DNR ( $\sigma=0.09$  (SP DNA),  $\sigma=0.21$  (NSP DNR)). Šie rezultatai rodo, kad tirpale su DNR sudarančio kompleksą BcnI konformacija tirpale yra atviresnė nei stebima BcnI-DNR kristalografinėse struktūrose (PDB ID 2ODI ir 3IMB), ir kad sąveikos su specifine DNR įtakota BcnI konformacija yra labiau apribota, nei sudarant kompleksą su nespecificine DNR. Vienodi, BcnI sąveikos su SP ir NSP DNR,  $E_{FRET}$  reikšmių skirstiniai rodo, kad specifinės sekos paieškos metu, BcnI su NSP DNR sudaro tokį pat kompleksą kaip ir su SP DNR (10B-C paveikslas). Didžiausia  $E_{FRET}$  reikšmė (0.72) gauta atliekant eksperimentą su apo-BcnI ir  $Ca^{2+}$  jonais (10A paveikslas, Lentelė 4).

**Lentelė 4. FRET efektyvumo vidurkiai ( $\mu$ ) ir standartiniai nuokrypiai ( $\sigma$ ).** Duomenys gauti atliekant FRET eksperimentus invertuotu konfokoliniu mikroskopu.  $E_{FRET}$  duomenų rinkiniai aproksimuoti Gauso skirstiniais.

BcnI konjugatas	Sąlygos	$E_{FRET}$	
		$\mu \pm s.e.m.$	$\sigma \pm s.e.m.$
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546	-	0.61±0.04	0.41±0.05
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546	10 mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	0.72±0.04	0.12±0.01
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546	nsp DNA	0.51±0.01	0.2±0.02
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546	nsp DNA+10 mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	0.58±0.02	0.21±0.02
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546	sp DNA	0.53±0.01	0.14±0.01
BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546	sp DNA+10 mM Ca(OAc) <sub>2</sub>	0.57±0.01	0.09±0.02
BcnI(N18C+C202S)-Alexa488	Alexa546-C-DNA+10 mM Ca(OAc)	0.35±0.04	0.11±0.01
		0.69±0.01	0.15±0.04
BcnI(N18C+C202S)-Alexa488	Alexa546-G-DNA+10 mM Ca(OAc)	0.26±0.01	0.11±0.01
		0.62±0.07	0.2±0.06
BcnI(V105C+C202S)-Alexa488	Alexa546-C-DNA+10 mM Ca(OAc)	0.3±0.02	0.1±0.01
		0.6±0.1	0.13±0.1
BcnI(V105C+C202S)-Alexa488	Alexa546-G-DNA+10 mM Ca(OAc)	0.31±0.1	0.29±0.1
		0.68±0.01	0.1±0.02
BcnI(C202S+K209C)-Alexa488	Alexa546-C-DNA+10 mM Ca(OAc)	0.24±0.01	0.11±0.01
		0.61±0.03	0.13±0.03
BcnI(C202S+K209C)-Alexa488	Alexa546-G-DNA+10 mM Ca(OAc)	0.16±0.06	0.25±0.06
		0.68±0.01	0.09±0.01

Gali būti, kad  $\text{Ca}^{2+}$  jonai yra koordinuojami neigiamai įkrautų aminorūgščių, esančių DNR surišimo kišenėje, ir dėl to yra suartinami katalitinis ir atpažinimo subdomenai, ant kurių išsidėsto fluorescentinės žymės.

$E_{FRET}$  reikšmių pokyčiai pridėjus DNA/ $\text{Ca}^{2+}$ , gauti ne dėl fluoroforų dipolių orientacijos pokyčių, o dėl BcnI subdomenų orientacijos pokyčių, nes  $\text{Ca}^{2+}$  ir DNR pridėjimas neturėjo įtakos vienu fluoroforu žymėto BcnI anizotropijos matavimams (Lentelė 3).



**10 paveikslas. BcnI struktūros konformacijų dinamika be ir su DNR.** Pavienių molekulių FRET eksperimentai buvo atlikti su dvigubai žymėtu BcnI(N18C+V105C+C202S)-Alexa488-Alexa546 baltymų naudojant konfokalinę mikroskopą. FRET efektyvumo histogramos gautos atlikus eksperimentus (A) be DNR, (B) su nespecificine DNR ir su (C) specifine DNR.

## 2.7. BcnI-nespecificinės DNR sąveikos dinamika

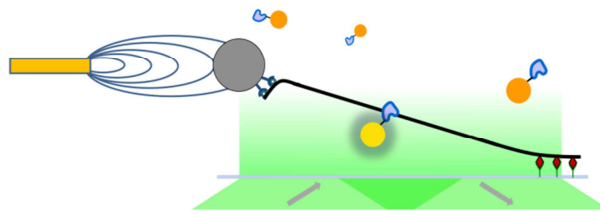
### 2.7.1. Pavienių BcnI molekulių vienmatė difuzija ir „šokčiojimai“ ant DNR.

Atlikę BcnI kinetinius eksperimentus nustatėme, kad BcnI orientacijos keitimas ant DNR, kuris yra reikalingas dvigrandinės DNR substrato pilnai hidrolizei (14 paveikslas), gali būti įvykdomas panaudojant „palengvintosios difuzijos“ mechanizmą, susidedantį iš

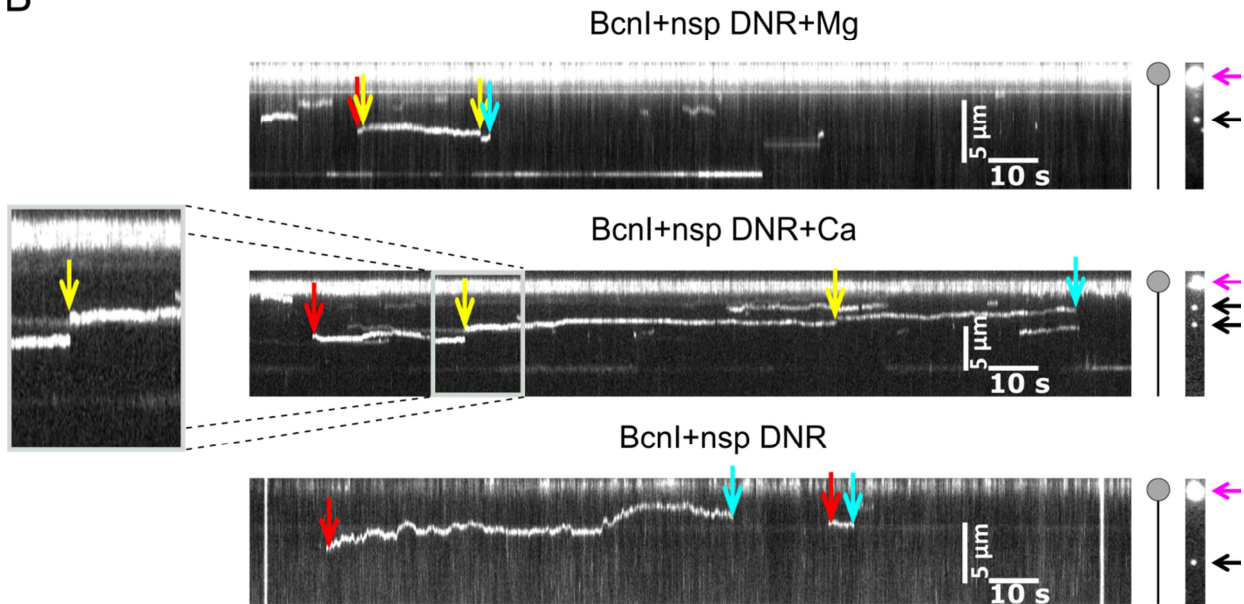
baltymų molekulių „šliaužiojimo“ ir „šokčiojimų“ ant nespecifinės DNR prie specifinės sekos (Sasnauskas et al., 2011). Pavienių BcnI molekulių vizualizacija ant ištemptų DNR molekulių ir jų charakterizavimas buvo atliktas su visiško vidinio atspindžio fluorescentinio mikroskopo ir magnetinio pinceto prietaisu (Schwarz et al., 2013). 22.8 kb nespecifinis DNR fragmentas, viename gale žymėtas digoksigeninu, o kitame gale – biotinu, po inkubacijos su streptovidinu dengtomis magnetinėmis dalelėmis (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1), buvo imobilizuotas ant antidigoksigeninu padengtos eksperimentinės celės ir, veikiant magnetu, ištemptas išilgai celės paviršiui. Pavienių kvantiniu tašku žymėtų BcnI baltymų (BcnI(V105C+C202S)-maleimid-PEG<sub>2</sub>-biotin-streptavidin-QDot625) detekcija buvo vykdoma kvantinį tašką žadinant 488 nm lazeriu esant visiškam vidiniam atspindžiui (angl. total internal reflection) (11A paveikslas). Žymėtam baltymui prisijungus prie DNR, buvo stebimas difrakcijos apribotas taškas, kuris keisdavo poziciją arba tolygiai „šliaužiodamas“ išilgai DNR ašies (vienmatė difuzija), arba pertraukiamai keisdamas poziciją ant DNR ( $\geq 100$  nm tarp dviejų detekcijos kadru, trunkančių 100 ms). Pertraukiami pozicijos pokyčiai buvo interpretuojami kaip „šuoliai“ – t.y. BcnI disociacijos ir reasociacijos ant tos pačios DNR molekulės naujoje pozicijoje. Dėl žemos BcnI koncentracijos ir aukšto detekcijos dažnio, tikimybė, kad po BcnI disociacijos po 100 ms ant DNR prisijungs nauja BcnI molekulė, yra labai maža (Bonnet et al., 2008).

Vienmatės (1D) BcnI difuzijos eksperimentai buvo atliekami be divalenčių metalo jonų, tirpale esant  $\text{Ca}^{2+}$  jonams, bei tirpale esant  $\text{Mg}^{2+}$  jonams. Atliekant eksperimentus be divalenčių metalo jonų, buvo stebimi ilgi ir nepertraukiami BcnI vienmatės difuzijos ant DNR atvejai, tuo tarpu esant  $\text{Mg}^{2+}$  ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonams, vienmatės difuzijos atvejai buvo trumpi, pertraukti „šuoliais“ arba nutraukti BcnI disociacija. (11B paveikslas).

A



B



**11 paveikslas. BcnI vienmatė difuzija ir šokčiojimas ant DNR.** (A) Eksperimento konfiguracija. 22.8 kbp nespėcinė DNR molekulė (juoda) buvo pritvirtinta prie eksperimentinės celės stiklo paviršiaus ir ištempta išilgai celės paviršiui magnetinę dalelę veikiant (pilka sfera) magnetiniu lauku. Kvantiniu tašku (geltonos ir oranžinės sferos) pažymėtos BcnI molekulės buvo žadinamos 488 nm lazeriu esant visiškam vidiniam atspindžiui (žalias), šiomis sąlygomis tik ant DNR ir arti stiklo paviršiaus (100-200 nm) esančios molekulės buvo sužadintos, o giliau tirpale esančios molekulės liko nesužadintos (oranžinės sferos) (B) Pavaizduoti kvantiniu tašku žymėto BcnI pozicijų nuo laiko rinkiniai gauti atlikus eksperimentus su  $Mg^{2+}$  jonais (viršutinis rinkinys, lygiagrečiai balta linija žymi nedifunduojantį, prie stiklo paviršiaus prikibusį BcnI), su  $Ca^{2+}$  jonais (vidurinis rinkinys), ir be divalenčių metalo jonų (apatinis rinkinys). Baltymo asociacijos su DNR, „šuoliai“ ir disociacijos atitinkamai pažymėtos raudonomis, geltonomis ir žydromis rodyklėmis. Magnetinės dalelės ir fluorescuojančio BcnI pozicijos pažymėtos dešinėje atitinkamai alyvinės spalvos ir juodomis rodyklėmis.

Iš BcnI pozicijų trajektorijų analizės, buvo gauti vidutinio kvadratinio pasiskirstymo (angl. Mean-squared displacement) nuo laiko grafikai, iš kurių paskaičiuoti vienmatės difuzijos koeficientai ( $D_{1D}$ ).  $D_{1D}$  reikšmės be divalenčių metalo jonų buvo  $1.7 \times 10^{-2} \mu m^2/s$ , su 10 mM  $Ca^{2+}$  –  $0.8 \times 10^{-2} \mu m^2/s$ , su 10 mM  $Mg^{2+}$  –  $0.4 \times 10^{-2} \mu m^2/s$  (12A paveikslas).  $1 \times 10^{-2} \mu m^2/s$  eilės 1D difuzijos koeficientai taip pat nustatyti ir kitiems su DNR sąveikaujantiems

baltymams (Bonnet and Desbiolles, 2011; Bonnet et al., 2008; Dikic et al., 2012; Gorman et al., 2007, 2010; Granéli et al., 2006; Harada et al., 1999; Kim and Larson, 2007; Komazin-Meredith et al., 2008; Laurence et al., 2008; Wang et al., 2006). Nustatyti kvantiniu tašku žymėtų BcnI baltymų  $D_{1D}$  koeficientai yra mažiausiai 1000 kartų mažesni, nei paskaičiuoti trimatės difuzijos koeficientai  $D_{3D}$  ( $30 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) (Halford, 2004; Wilkins et al., 1999). Žymus difuzijos koeficiento sumažėjimas, nustatytas ir kitiems su DNR sąveikaujantiems baltymams (Bonnet et al., 2008), gali būti susijęs su kvantiniu tašku pažymėto baltymo hidrodinamika, „šliaužiojančio“ palei DNR spiralės trajektoriją (Bagchi et al., 2008; Schurr, 1979), bei su DNR-baltymo sąveika „šliaužiojimo“ metu (Slutsky and Mirny, 2004). Lėtesnė difuzija esant divalenčiams metalo jonams, koreliuoja su BcnI uždara konformacija, nustatyta esant  $\text{Ca}^{2+}$  ir DNR (10 paveikslas), kuri gali būti reikalinga DNR sekos tikrinimui specifinės sekos paieškos metu.

Teoriniais ir eksperimentiniais metodais yra nustatyta, kad su DNR sąveikaujantys baltymai, specifinės sekos paieškai naudoja vienmatę difuziją (1D), kuri reikalinga sekos tikrinimui, bei trimatę difuziją (3D), kurios metu baltymas dėl disociacijos-asociacijos yra perkeliamas ant naujo DNR molekulės domeno. Taip pat yra nustatyta, kad 1D ir 3D difuzijų kombinacija labiau pagreitina taikinio suradimo procesą, nei atskirų difuzijos metodų naudojimas (Halford, 2004).

Vienos molekulės eksperimentų metu be vienmatės difuzijos buvo detektuojami 100-1000 nm translokacijos įvykiai tarp gretimų kadru (100 ms) (11 B paveikslas, 12 B paveikslas), kurių difuzijos koeficientai turėtų būti  $\sim 0.1-10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Literatūroje minimų nustatytų  $D_{1D}$  difuzijos koeficientų reikšmės yra žymiai mažesnės, todėl šie translokacijos įvykiai buvo analizuojami kaip 3D „šuoliai“ ant DNR (Bonnet et al., 2008). Nustatyta, kad be divalenčių metalo jonų, „šuoliai“ ant DNR yra reti (viena  $\geq 100$  nm translokacija kas 160 s), tačiau esant  $\text{Ca}^{2+}$  ir  $\text{Mg}^{2+}$  jonų, „šuoliai“ vyksta dažniau (viena  $\geq 100$  nm translokacija kas 20-25 s, 11 B paveikslas). Taigi divalenčiai metalo jonai palengvina BcnI disociaciją nuo DNR. Kaip ir vienmatės difuzijos eksperimentuose su EcoRV (Bonnet et al., 2008; Loverdo et al., 2009), buvo pastebėta, kad BcnI „šuolių“ dažnis mažėja didėjant „šuolio“ dydžiui (12 B paveikslas). Dėl ribotos prietaiso skiriamosios gebos, „šuoliai“ trumpesni nei 100 nm yra nedetektuojami. Pagal Kolesov et al. teoriją (Kolesov et al., 2007), kuri teigia, kad vienmatės difuzijos metu tarp „šuolių“ įvyksta 5 „šokčiojimai“ (t.y. „šuoliai“ trumpesni nei 50 nm, vienas DNR patvarumo ilgis (angl. persistence length)), buvo paskaičiuoti BcnI vienmatės difuzijos laikų viršutiniai įverčiai, kurie be metalo jonų yra  $\sim 30$  (150/5) s, esant divalenčiams metalo jonams  $\sim 4$  (20/5) s. Iš gautų  $D_{1D}$  difuzijos koeficientų ir vienmatės difuzijos laikų reikšmių, paskaičiavome DNR fragmento ilgį [ $l_{st}=(2 \cdot D_{1D} \cdot t)^{0.5}$ ], kurį BcnI nuskaito vienos asociacijos su DNR metu. Be divalenčių metalo jonų BcnI nuskaito 3500 bp ( $\sim 1000$  nm), o esant  $\text{Mg}^{2+}$  arba  $\text{Ca}^{2+}$  jonams - 700 bp ( $\sim 200$  nm). Pažymima, kad dėl mažesnio hidrodinaminio radiuso, BcnI nežymėto kvantiniu tašku, DNR nuskaitomos sekos ilgis galėtų būti apie 2 kartus didesnis (Dikic et al., 2012). Paskaičiuotas BcnI DNR nuskaitomos sekos ilgis yra suderinamas su BcnI dvitaikininio DNR substrato (atstumas tarp taikinių 500 bp) dideliu hidrolizės procesyvumu. (13 paveikslas).

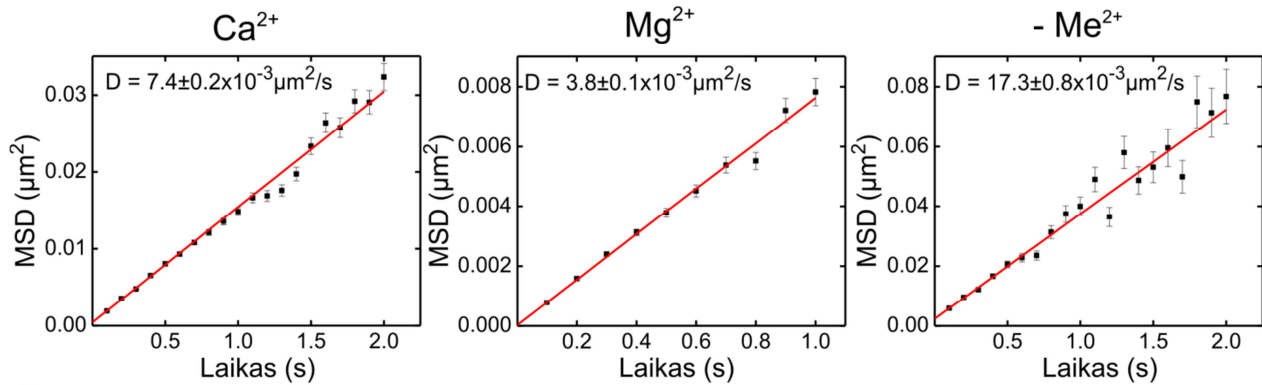


Pagal Halford ir Marko teoriją (Halford, 2004), specifinio taikinio suradimo pagreitinėjimas virš bimolekulinės reakcijos asociacijos greičio ( $k_a$ ), apriboto molekulių 3D difuzija ( $D_{3D} \cdot a$ ), yra išreiškiamas lygtimi (10):

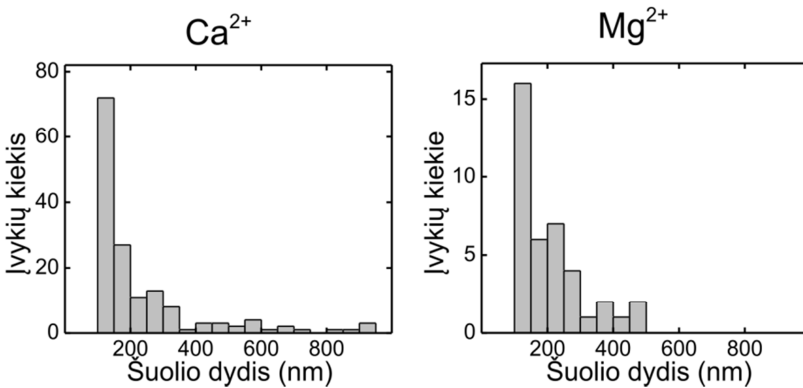
$$\frac{k_a}{D_{3D}a} = \left( \frac{a}{l_{sl}} + \frac{D_3}{D_1} aLl_{sl}c \right)^{-1} \quad (10)$$

$a=1.7$  nm (5 bp BcnI atpažinimo sekos ilgis),  $L=1000$  nm (3000 bp DNR fragmento ilgis),  $c=1 \times 10^{-10}$  nm<sup>-3</sup> (~0.1 nM specifinių taikinių koncentracija išreikšta molekulių kiekiu kvadratiniam nanometre). Į lygtį įstačius paskaičiuotus DNR nuskaitomos sekos ilgius ( $l_{sl}$ ) ir ( $D_{1D}$ ,  $D_{3D}$ ) difuzijos koeficientus, nustatėme nuo 3 iki 8 kartų specifinio taikinio suradimo pagreitinimą. Nespecifinėje BcnI-DNR sąveikoje, divalenčiai metalo jonai atlieka dvi funkcijas: sumažina  $D_{1D}$  (greičiausiai dėl stipresnės BcnI ir DNR sąveikos) ir padidina BcnI disociacijos greitį (arba „šuolių“ dažnį).

A



B

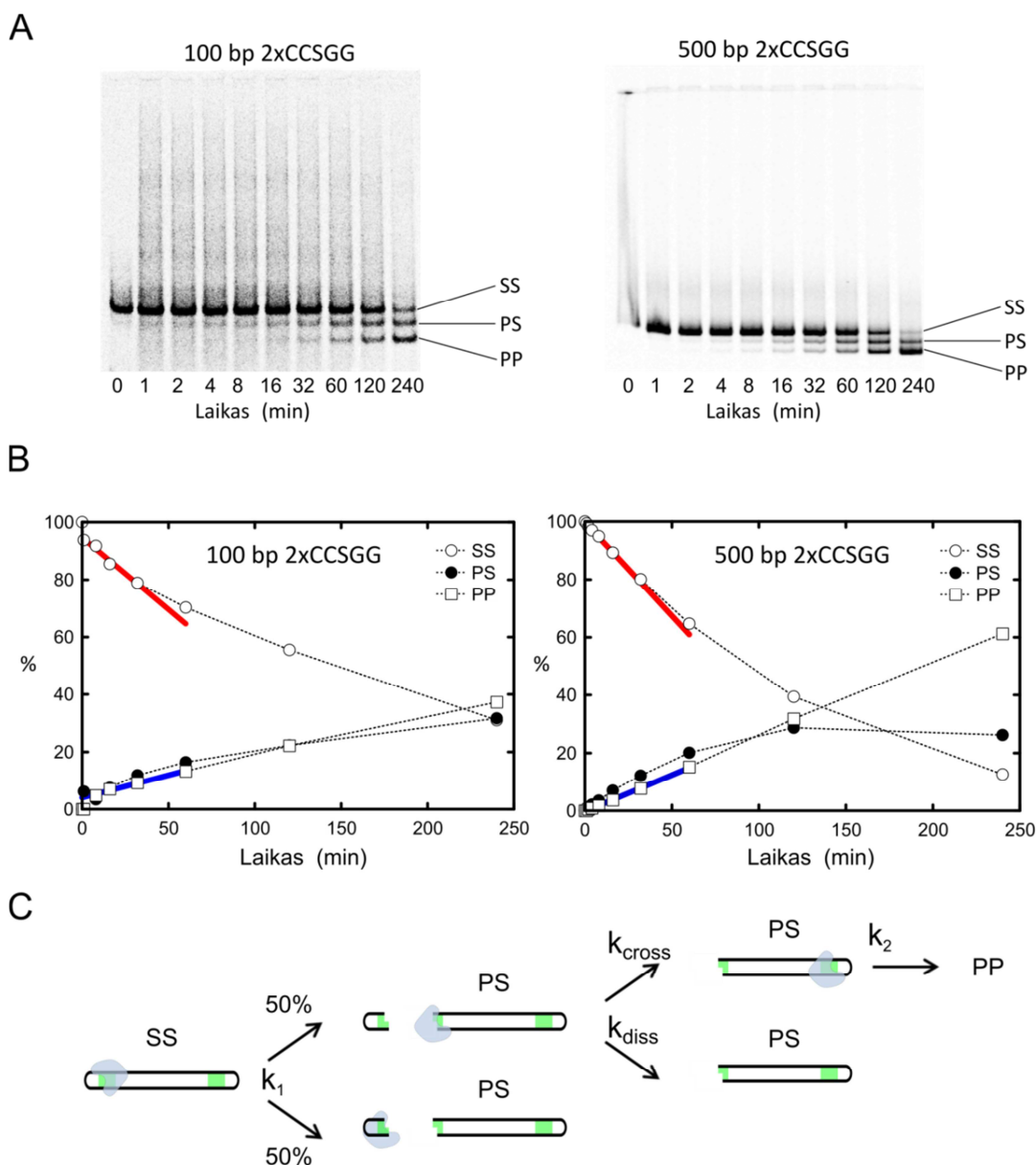


**12 paveikslas. BcnI vienmatės difuzijos koeficientai ir „šuolių“ dydžiai.** (A) BcnI vienmatės difuzijos vidutinio kvadratinio pasiskirstymo (MSD) funkcijos nuo laiko buvo gautos atlikus eksperimentus su  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ir be divalenčių metalo jonų.  $D_{1D}$  difuzijos konstantos buvo paskaičiuotos, pritaikius linijines funkcijas (raudonos linijos) vidutinio kvadratinio pasiskirstymo duomenų rinkiniams. (B) „Šuolių“ dydžių skirstiniai esant  $\text{Mg}^{2+}$  ir  $\text{Ca}^{2+}$  jonams. „Šuoliai“ eksperimentuose be divalenčių metalo jonų pasitaikydavo labia retai, todėl skirstinio negavome.

## 2.7.2. BcnI procesyvumo eksperimentai

Nepriklausomas DNR fragmento ilgis, kurį BcnI nuskaityto vienos asociacijos su DNR metu, buvo gautas pamatavus BcnI procesyvumą – baltymo savybę hidrolizuoti kelis specifinius taikinius vienos asociacijos su DNR metu. Vienmatės BcnI difuzijos eksperimentai ant nespecifinės ištemptos DNR, parodė, kad vienos asociacijos su DNR metu BcnI nuskaityto apie 700 bp DNR regioną. Gauti rezultatai leido iškelti prielaidą, kad BcnI gali procesyviai hidrolizuoti kelis specifinius taikinius, išsidėsčiusius kelių šimtų bp atstumu. BcnI procesyvumo nustatymui buvo atlikti stacionarūs kinetiniai eksperimentai su dvitaikininiais 135 ir 535 bp DNA ( $2 \times \text{CCSGG}$ ) substratais (atstumai tarp taikinių substratuose 100 bp ir 500 bp, 1C paveikslas, 13 paveikslas). Maksimalus laukiamas BcnI procesyvumas (atitinka DNR molekulių dalį, kurių abu specifiniai taikiniai hidrolizuoti vieno BcnI asociacijos su DNR įvykio metu) yra 50 %, nes po pirmojo DNR taikinio hidrolizės 50% BcnI molekulių lieka asocijuotos su DNR fragmentu turinčiu antrąjį specifinį taikinį (likusios 50% BcnI molekulių lieka asocijuotos su DNR fragmentu neturinčiu antrojo specifinio taikinio, 13C paveikslas). BcnI procesyvumas buvo paskaičiuotas kaip du kartus hidrolizuoto produkto (PP) susidarymo ir dvitaikininio DNR substrato (SS) sumažėjimo pradinių greičių santykis  $|v_{PP}/v_{SS}|$ , kuris atitinka du kartus hidrolizuoto produkto (PP) santykinį kiekį reakcijos pradinėje stadijoje. Procesyvumas artimas teoriniam maksimumui (50%), kai BcnI difuzija iki antrojo specifinio taikinio ir jo hidrolizė yra žymiai greitesnė, nei disociacija nuo DNR ( $k_{cross} \gg k_{diss}$ ). Kadangi BcnI disociacija ir orientacijos keitimas ant DNR yra konkuruojantys procesai ir gali vykti panašiais greičiais, procesyvumą galima išreikšti išraiška  $50 \% \times k_{cross}/(k_{cross}+k_{diss})$ .

Nehidrolizuota (SS), DNR formos su vienu hidrolizuotu taikiniu (PS) ir su dviem hidrolizuotais taikiniiais (PP) buvo atskirtos nedenatūruojančiomis sąlygomis poliakrilamidinės elektroforezės pagalba (13A paveikslas), skirtingi DNR formų kiekiai įvertinti densitometrinės analizės būdu, o pradiniai SS sumažėjimo ir PP susidarymo greičiai buvo įvertinti linijinės regresijos metodu (13B paveikslas). Paskaičiuotas BcnI procesyvumas ( $|v_{PP}/v_{SS}|$ ) yra ~41-43 %, tai atitinka 4 kartus didesnę BcnI orientacijos ant DNR pakeitimo greitį ( $k_{cross}$ ) už disociacijos greitį ( $k_{diss}$ ). Procesyvumo eksperimentai rodo, kad BcnI po pirmojo specifinio taikinio hidrolizės geba atpažinti antrąjį specifinį taikinį 500 bp atstumu nedisocijuodamas nuo DNR ir jį hidrolizuoti.



**13 paveikslas. BcnI reakcijos su dvitaikininiais DNR substratais.** Stacionariosios BcnI kinetinės reakcijos buvo atliktos su dvitaikininiais „135” ir „535” DNA (2×CCSGG) substratais (atstumai tarp taikinių atitinkamai 100 bp ir 500 bp, 1C paveikslas). (A) Nehidrolizuotos (SS), DNR formos su vienu hidrolizuotu taikiniu (PS) ir su dviem hidrolizuotais taikiniiais (PP) buvo atskirtos poliakrilamidinės elektroforezės nedematūruojančiomis sąlygomis pagalba. (B) Skirtingi DNR formų kiekiai buvo įvertinti densitometrinės analizės būdu. Pradiniai SS sumažėjimo ir PP susidarymo greičiai buvo įvertinti linijinės regresijos pagalba. (C) Reakcijos schema. Procesyvi dvitaikininio DNR substrato hidrolizė yra įmanoma, jei po pirmosios specifinio taikinio hidrolizės BcnI lieka ant DNR fragmento su antruoju specifiniu taikiniu (tikimybė 1/2) ir po to suranda antrąjį specifinį taikinį greičiau nei disocijuoja nuo DNR (tikimybė  $k_{cross}/(k_{cross}+k_{diss})$ ). Nustatytas BcnI procesyvumas (procesyviai hidrolizuotos DNR dalis) „135” ir „535” substratams yra atitinkamai 0.43 ir 0.41.

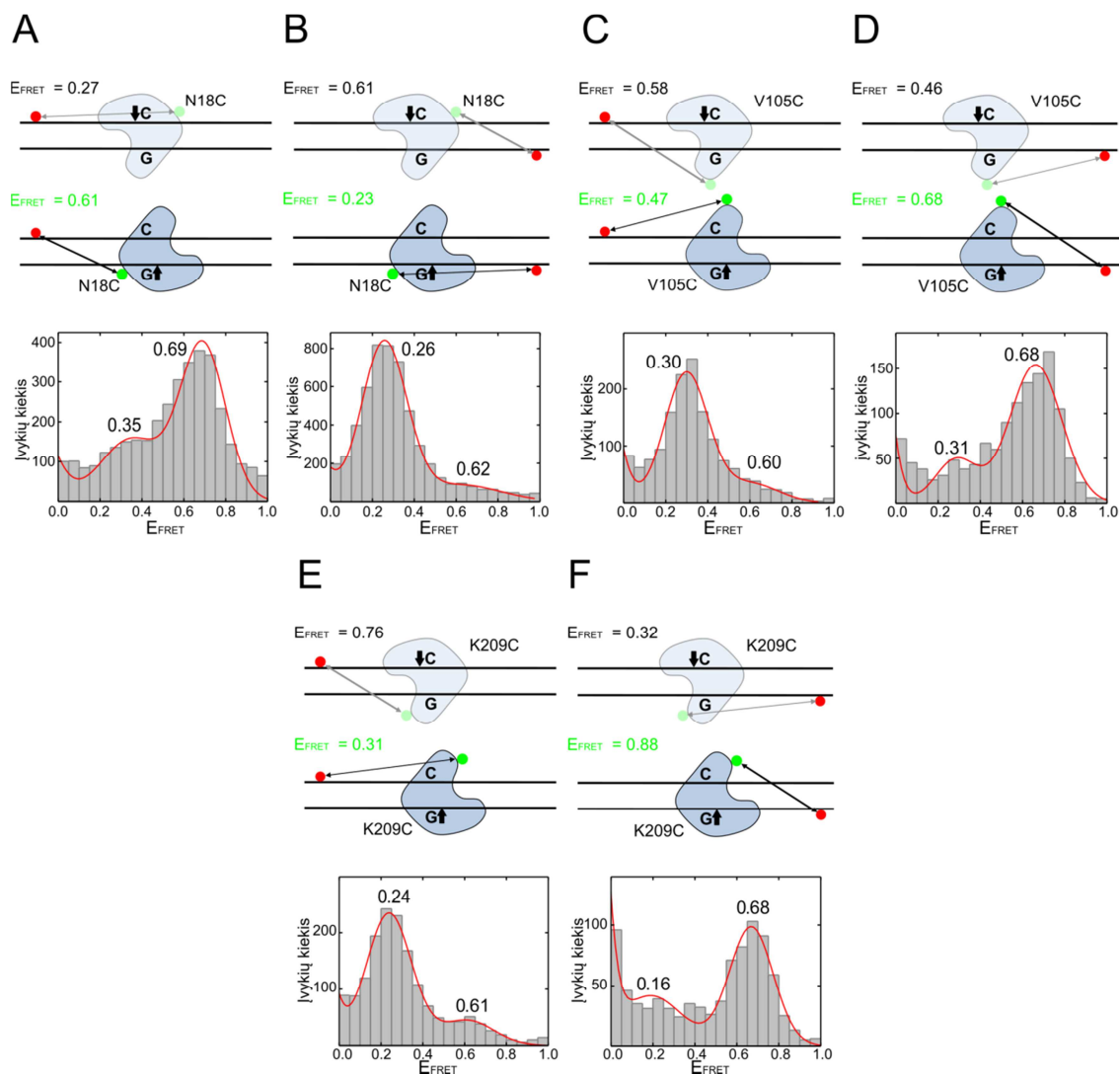


## 2.8. BcnI-DNR specifinė sąveika

### 2.8.1. Vyraujanti BcnI orientacija sąveikaujant su specifine DNR.

BcnI yra monomerinė restrikcijos endonukleazė, atpažįstanti pseudopalindrominę seką 5'-CCSGG-3' ir turinti vieną aktyvų centrą. Kristalografinių struktūrų analizė rodo, kad BcnI sudaro dviejų tipų kompleksus, kuriuose aktyvų centrą orientuoja ties atpažinimo sekos DNR grandine su centriniu 'C' nukleotidu (5'-CCCCGG-3', PDB ID 2ODI) arba išdėsto aktyvų centrą netoli atpažinimo sekos grandinės su centriniu G nukleotidu (5'-CCGGG-3', PDB ID 3IMB). Dvigrandinės specifinės DNR hidrolizės eksperimentai rodo, kad BcnI vienu aktyviu centru vieną po kitos hidrolizuoja abi atpažinimo sekos grandines (7 paveikslas). Toks hidrolizės reakcijos mechanizmas gali vykti, jei BcnI su savo atpažinimo seka paeiliui sudaro asimetrinius kompleksus, kurių struktūros yra nustatytos (8 paveikslas) (Sokolowska et al., 2007). Atlikti „vienos apskukos“ kinetiniai eksperimentai su specifiniais oligodupleksais rodo, kad BcnI hidrolizuoja daugumą molekulių per DNR tarpinį produktą su viengrandiniu trūkiu (VT) 'G' grandinėje. Gauti rezultatai leidžia manyti, jog vyraujanti BcnI sąveikos su DNR orientacija yra kai BcnI aktyvų centrą orientuoja ties „G“ grandine (Sasnauskas et al., 2011).

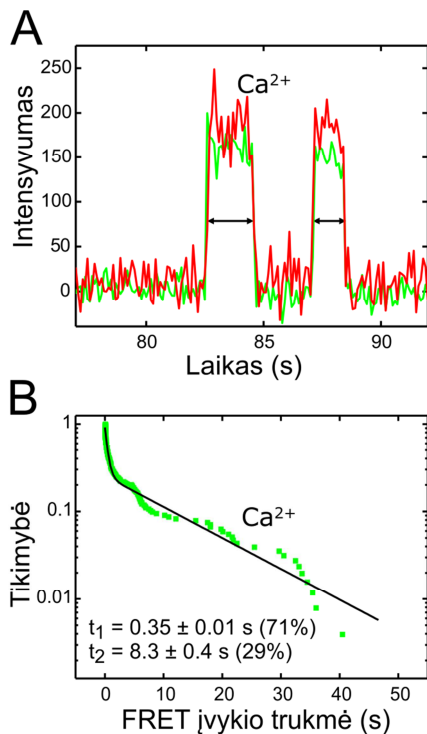
Iškeltai hipotezei patikrinti, atlikome pavienių laisvai difunduojančių baltymo-DNR kompleksų FRET eksperimentus, naudojant konfokalinę mikroskopą (žr. Metodai). Atlikus FRET eksperimentus su Alexa488 žymėtu BcnI(N18C+C202S) ir su Alexa546 žymėta DNR, buvo nustatytos dvi FRET efektyvumo populiacijos: retai detektuojama - su žemomis  $E_{FRET}$  reikšmėmis ( $E_{FRET}=0.35$ ) ir vyraujanti - su aukštomis  $E_{FRET}$  reikšmėmis ( $E_{FRET}=0.69$ ). Abi gautos reikšmės koreliuoja su teorinėmis  $E_{FRET}$  reikšmėmis, paskaičiuotomis BcnI(N18C+C202S)-Alexa488 sąveikai su Alexa546-C-DNA 'C' ( $E_{FRET}=0.27$ ) ir 'G' ( $E_{FRET}=0.61$ ) orientacijose (14A paveikslas). Priešingas  $E_{FRET}$  reikšmių pasiskirstymas buvo stebimas eksperimente su Alexa546-G-DNA, kur žemos  $E_{FRET}$  reikšmės vyravo (0.26), o aukštos  $E_{FRET}$  reikšmės buvo retai detektuojamos (0.62), abi gautos reikšmės atitiko apskaičiuotas teorines 0.23 ir 0.61  $E_{FRET}$  reikšmes (14B paveikslas). Duomenys gauti atlikus vienos molekulės eksperimentus, rodo, kad vyraujanti BcnI ir DNR sąveikos orientacija yra, kai BcnI aktyvų centrą orientuoja ties 'G' grandine. Išvada buvo patvirtinta atlikus eksperimentus su BcnI(V105C+C202S)-Alexa488 ir BcnI(C202S+K209C)-Alexa488 (14C-F paveikslas, Lentelė 4).



**14 paveikslas. BcnI sąveikos su DNR orientacijos primenybė.** Pavienių molekulių FRET eksperimentai konfokaliniu mikroskopu buvo atliekami su Alexa488 žymėtu BcnI(N18C+C202S) ir su Alexa546 žymėta DNR. (A) FRET efektyvumo ( $E_{FRET}$ ) histogramos gautos iš eksperimentų su C-DNR-Alexa546. BcnI-DNR kompleksų struktūrų (PDB ID 2ODI ir 3IMB) analizė rodo, kad atstumai tarp Alexa488 (žalia sfera, N18 C $\beta$  atomas) ir Alexa546 (raudona sfera, -14 pozicija nuo BcnI atpažinimo sekos, C5 atomas) fluoroforų yra 71.3 ir 56.2 Å skirtinguose kompleksuose, tai atitinka 0.27 ir 0.61 FRET efektyvumo reikšmes (viršutinė schema) BcnI baltymams orientuojantiems aktyvųjų centrą ties 'C' (5'-CCCGG-3', PDB ID 2ODI) ir 'G' (5'-CCGGG-3', PDB ID 3IMB). FRET reikšmių skirstiniui pritaikius dvigubą Gauso funkciją (raudona linija), gautos  $E_{FRET}$  reikšmės (0.35 ir 0.61) atitiko teorines. Rezultatai rodo, kad BcnI sudarydamas kompleksą su DNR, pirmenybę teikia sąveikai su 'G' grandine (5'-CCGGG-3'). (B) Tokios pat išvados padarytos atlikus eksperimentus su BcnI(N18C+C202S)-Alexa488 ir C-DNA-Alexa546 bei su BcnI(V105C+C202S)-Alexa488 (C), (D) ir BcnI(C202S+K209C)-Alexa488 (E), (F). Visais atvejais teorinės  $E_{FRET}$  reikšmės koreliuoja su eksperimentiniais duomenimis. Fioersterio spindulių ( $R_0$ ), išmatuotų BcnI konjugatams su DNR ir Ca<sup>2+</sup>jonais, reikšmės naudotos teorinių  $E_{FRET}$  reikšmių paskaičiavimui pateiktos Lentelėje 3.

## 2.8.2. BcnI ir specifinės DNR pavienių molekulių sąveikos dinamika.

Atlikus kinetinius eksperimentus, nustatytas pilnas BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės mechanizmas rodo, kad po pirmosios specifinio DNR taikinio hidrolizės, antrosios grandinės hidrolizę limituoja, ne hidrolizės greitis, o BcnI orientacijos pakeitimas ant DNR. Taip pat nustatyta, kad BcnI orientacijos keitimo metu išlaisvina specifinį taikinį, bet nedisocijuoja nuo DNR. BcnI-specifinės DNR sąveikos dinamika buvo ištirta atlikus eksperimentus naudojant objektyvo tipo TIRF mikroskopą su dviejų fluoroforų FRET detekcija sistema (Kemmerich et al., 2015). Cy5 žymėti biotinilinti 36 bp DNR oligodupleksai (Lentelė 1) buvo imobilizuoti ant eksperimentinės celės paviršiaus, jų padėtys nustatytos celę žadinant 2 s 642 nm lazeriu, esant visiškai vidiniam atspindžiui. 0.2 nM BcnI(N18C+C202S)-Cy3 „Matavimo buferyje“ su 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  jonų, buvo užnešta į eksperimentinę celę ir BcnI konjugatas buvo žadinamas 532 nm lazeriu. Cy3 žymėto BcnI ir Cy5 žymėtos DNR asociacijos įvykiai koreliavo su reikšmingais fluorescencijos intensyvumo padidėjimais, užfiksuotais donoro ir akceptoriaus detekcijos kanaluose (15A paveikslas). Reikšmingų FRET efektyvumų ( $E_{FRET} > 0.1$ ) trukmės buvo aprašytos dviejų eksponenčių skirstiniu, apibūdinančiu dviejų tipų BcnI-DNA sąveikas (15B paveikslas). Nustatyti trumpai gyvuojantys kompleksai (vidutinė gyvavimo trukmė 0.35 s) buvo dažnesni (~70 % visų įvykių), nei ilgai gyvuojantys kompleksai (vidutinė gyvavimo trukmė 8.3 s). Manoma, kad trumpai gyvuojantys įvykiai atitinka nespecifinius BcnI-DNR kompleksus, tuo tarpu ilgai gyvuojantys įvykiai atitinka specifinius BcnI-DNR kompleksus.



### 15 paveikslas. BcnI ir specifinės DNR pavienių molekulių sąveikos dinamika.

Pavienių molekulių FRET eksperimentai su objektyvo tipo TIRF mikroskopu, buvo atlikti su ant paviršiaus imobilizuotais 36 bp Cy5 žymėtais DNA oligonukleotidais ir Cy3-žymėtu BcnI(N18C+C202S) esant 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  jonų. (A)  $E_{FRET}$  laiko trukmės buvo nustatytos iš donoro ir akceptoriaus fluorescencijos intensyvumų detektuojamų ant pavienių DNR molekulių pozicijų. Juodos rodyklės nurodo BcnI-DNR asociacijų trukmes. (B) Išmatuotų  $E_{FRET}$  įvykių trukmių kumuliacinis skirstinys. Dviejų eksponenčių funkcija, pritaikyta skirstiniui pažymėta juoda linija. Aprašyto skirstinio parametrai nurodyti grafike.

### 2.8.3. BcnI specifinio taikinio antrosios DNR grandinės hidrolizės pavienių molekulių eksperimentai.

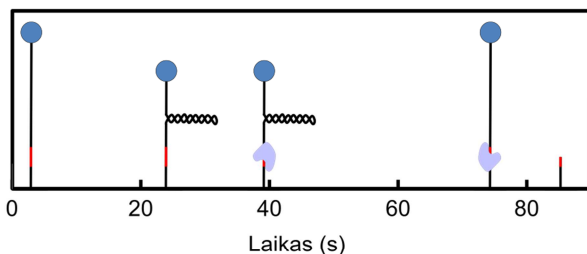
Norėdami tiesiogiai išmatuoti laiką, reikalingą BcnI orientacijos pakeitimui po pirmosios specifinio DNR taikinio grandinės hidrolizės, atlikome pavienių DNR molekulių hidrolizės eksperimentus naudojant magnetinį pincetą. (van Aelst et al., 2010; Rutkauskas et al., 2015). 7.4 kbp DNR konstruktas, viename gale turintis digoksigeniną, o kitame gale per biotino - streptavidino sąveiką prijungtą magnetinę dalelę, buvo imobilizuotas ant eksperimentinės celės paviršiaus ir ištemptas statmenai celei 2 pN jėga naudojant porą magnetų. DNR molekulė buvo teigiamai superspiralizuota, dėl 25 apsisukimų susidarė plektoneminė superspiralė ir stebima DNR sutrumpėjo. (16A paveikslas). Į celę įvedus BcnI, bus stebimi du vienas po kito sekantys įvykiai. Dėl pirmosios specifinio DNR taikinio hidrolizės stebimas DNR pradinio ilgio atsistatymas, o pilnai perkirpus DNR stebimas magnetinės dalelės pranykimas. (16B paveikslas). Laiko intervalų tarp pirmojo ir antrojo įvykio, kumuliacinis skirstinys buvo analizuojamas dviejų eksponenčių funkcija. Apskaičiuotos antrosios DNR grandinės hidrolizės konstantos  $k_{obs}(1)=0.3\pm 0.1 \text{ s}^{-1}$  (30% hidrolizės įvykių) ir  $k_{obs}(2)=0.06\pm 0.01 \text{ s}^{-1}$  (70% hidrolizės įvykių) (16B paveikslas) koreliuoja su oligodupleksų antrosios DNR grandinės hidrolizės konstantomis  $k_{obs}(G)=0.32 \text{ s}^{-1}$  (antrosios 'G' grandinės hidrolizė, ~30 % visos DNR),  $k_{obs}(C)=0.14 \text{ s}^{-1}$ . (antrosios 'C' grandinės hidrolizė, ~70 % visos DNR) (Sasnauskas et al., 2011). Kartu šie eksperimentai įrodo, kad dauguma BcnI molekulių su DNR sudaro kompleksą sąveikaujant su 'G' grandine (14 paveikslas, 16 paveikslas).

Antrosios DNR grandinės hidrolizės konstanta  $k_{obs}$  gali būti išreikšta lygtimi (11),

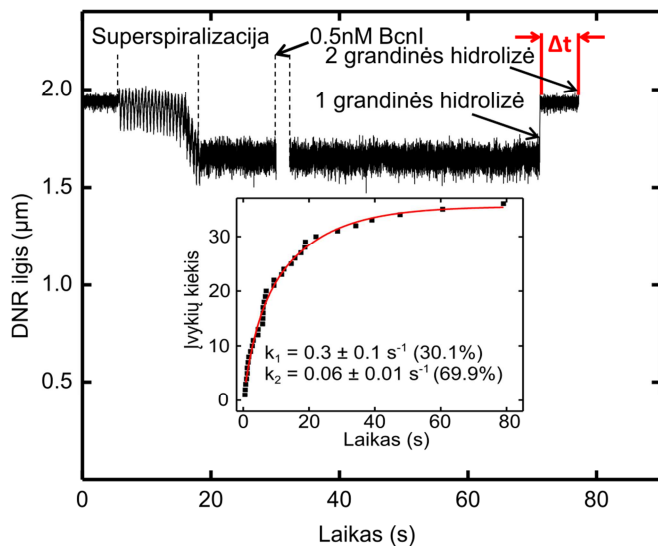
$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{k_{dissoc}} + \frac{1}{k_{flip}} + \frac{1}{k_{chem}} \quad (11)$$

kur  $k_{dissoc}$ ,  $k_{flip}$  ir  $k_{chem}$  atitinkamai yra fermento disociacijos nuo taikinio, reasociacijos ir antrosios grandinės hidrolizės konstantos. Kinetiniai eksperimentai rodo, kad DNR hidrolizė greita, o pavienių molekulių vienmatės difuzijos eksperimentai rodo, kad „šuošis“ trunka ne ilgiau 0.1 s. Remiantis šiais duomenimis galime teigti, jog BcnI specifinio DNR taikinio antrosios DNR grandinės hidrolizę riboja BcnI disociacija nuo specifinio taikinio po pirmosios DNR grandinės hidrolizės.

A



B



### 16 paveikslas. Pavienių DNR molekulių hidrolizė monomere restrikcijos endonukleaze BcnI.

(A) Eksperimento schema. 7.4 kbp specifinis DNR fragmentas su magnetine dalele bei turintis vieną BcnI atpažinimo seką, buvo imobilizuotas eksperimentinės celės paviršiuje. Veikiant 2 pN jėgos magnetiniu lauku, DNR konstruktas buvo ištemptas statmenai celės paviršiui bei teigiamai superspiralizuotas 25 apskukimais. Pridėjus 0.2-1 nM BcnI, po pirmosios DNR grandinės hidrolizės, plektoneminė superspiralė išsivyniojo ir DNR konstrukto ilgis atsistatė. Po antrosios DNR grandinės hidrolizės, stebėjome magnetinės dalelės išnykimą. Laiko skirtumas tarp pirmojo ir antrojo įvykio yra viengrandininį trūkį (VT) turinčios DNR gyvavimo trukmė, kurio atvirkštinis dydis yra antrosios DNR grandinės hidrolizės greičio konstanta. (B) Eksperimentų rezultatai. Laiko intervalų, tarp pirmojo ir antrojo įvykio, kumuliacinis skirstinys buvo analizuojamas dviejų eksponenčių funkcija ir apskaičiuotos antrosios grandinės hidrolizės konstantos  $k_{obs}(1)=0.3\pm 0.1\text{ s}^{-1}$  (30% hidrolizės įvykių) ir  $k_{obs}(2)=0.06\pm 0.01\text{ s}^{-1}$  (70% hidrolizės įvykių).

Skirtingi pavienių molekulių tyrimo metodai leido ištirti BcnI dvigrandinės DNR hidrolizės stadijas, kurių neįmanoma nustatyti tradiciniais tyrimo metodais. Vienmatės difuzijos ant DNR eksperimentai atskleidė, kad BcnI geba „šokčioti“ ant DNR. Atlikus FRET eksperimentus nustatyta BcnI subdomenų konformacinė dinamika, BcnI susirišimo su specifiniu taikiniu orientacija ir BcnI DNR sąveikos dinamika. Pavienių molekulių eksperimentų gauti rezultatai patvirtino BcnI reakcijos mechanizmą, nustatytą atlikus kinetines reakcijas, bei papildė jį naujais parametrais: BcnI-DNR disociacijos laikais, „šliaužiojimo“ ilgiais ar „šokčiojimo“ dažniais. Pavienių molekulių tyrimo technologijos gali būti sėkmingai pritaikytos kitų su DNR sąveikaujančių baltymų tyrimui.

## IŠVADOS

- BcnI sudaro asimetrinį kompleksą su specifine 5'-CCSGG-3' seka, hidrolizuoja pirmąją DNR grandinę, keičia sąveikos orientaciją su specifine DNR ir hidrolizuoja antrąją DNR grandinę.
- BcnI specifinio taikinio, antrosios DNR grandinės hidrolizės greitį riboja BcnI orientacijos pakeitimas ant DNR, po pirmosios DNR grandinės hidrolizės reakcijos. Ta pati BcnI molekulė nedisocijuodama hidrolizuoja abi specifinio taikinio grandines.
- Monomerinė restrikcijos endonukleazė BcnI, specifinį taikinį suranda bei sąveikos orientaciją su DNR keičia, naudodama „palengvintosios difuzijos“ mechanizmą. Dėl gebėjimo „šliaužioti“ ir „šokčioti“, BcnI gali procesyviai hidrolizuoti kelis specifinius taikinius nutolusius vienas nuo kito 500bp atstumu.
- Apo-formos BcnI DNR surišimo kišenė, kurią sudaro katalitinis ir atpažinimo subdomenai, yra nefiksuotos konformacijos. BcnI sąveika su divalenčiais metalo jonais suartina subdomenus ir užfiksuoja jų konformaciją.



# MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

## Disertacijoje paskelbta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Sasnauskas G, **Kostiuk G**, Tamulaitis G and Siksnys V (2011) Target site cleavage by the monomeric restriction enzyme BcnI requires translocation to a random DNA sequence and a switch in enzyme orientation. *Nucleic Acids Res.*, 39, 8844-56.
2. **Kostiuk G**, Dikić J, Schwarz F W, Sasnauskas G, Seidel R. and Siksnys V (2017). The dynamics of the monomeric restriction endonuclease BcnI during its interaction with DNA. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkx294. [Epub ahead of print].

## Kitos publikacijos:

3. **Kostiuk G**, Sasnauskas G, Tamulaitiene G and Siksnys V (2011) Degenerate sequence recognition by the monomeric restriction enzyme: single mutation converts BcnI into a strand-specific nicking endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 39, 3744–3753.
4. Kazlauskienė M, Tamulaitis G, **Kostiuk G**, Venclovas Č, Siksnys V. (2016) Spatiotemporal Control of Type III-A CRISPR-Cas Immunity: Coupling DNA Degradation with the Target RNA Recognition. *Mol. Cell.*, 62(2), 295-306.

## Disertacijoje paskelbta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. Dikić J, **Kostiuk G**, Siksnys V, Seidel R. Protein diffusion on DNA. Diffusion fundamentals V. Leipzig, Germany, 2013.08.26-28.
2. **Kostiuk G**, Dikić J, Sasnauskas G, Seidel R and Siksnys V. Monomeric restriction enzyme diffusion on DNA. IRTG-workshop. Sankt Petersburg, Russia, 2013.09.17-20.
3. Dikić J, **Kostiuk G**, Siksnys V, Seidel R. Single molecule analysis of monomeric restriction enzyme BcnI. Machines on genes: Nucleic Acids Enzymes. Snowmass Village, Colorado, USA, 2014.06.22-27.
4. **Kostiuk G**, Dikić J, Sasnauskas G, Seidel R and Siksnys V. Single molecule analysis on restriction enzyme BcnI. Single biomolecules – in silico, in vitro and in vivo. Hertfordshire, UK, 2014.09.11-13.
5. **Kostiuk G**, Dikić J, Sasnauskas G, Seidel R and Siksnys V. Single-molecule analysis of the monomeric restriction enzyme BcnI. 7<sup>th</sup> New England Biolabs Meeting on Restriction and Modification. Gdansk, Poland, 2015.08.24-29.

## Finansinė parama:

Disertacijoje aprašyti darbai buvo finansuojami Visuotinės dotacijos (R-100), Lietuvos mokslo tarybos (KEL-11460, DOC-13060) bei 'MoBiLi' programos FP7-REGPOT-2009-1 lėšomis.

# CURRICULUM VITAE

**Vardas, Pavardė** Georgij Kostiuk

**Gimimo data** 1985 05 01

**Darbo adresas** Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius  
Biotechnologijos institutas  
Vilniaus universitetas  
Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius

**Telefonai** +370 5 2234366 (darbo)  
+370 615 37353 (asmeninis)

**Faksas** +370 5 2234367 (darbo)

**E-paštas** georgij.kostiuk@ibt.lt  
georgij.kostiuk@bti.vu.lt

**Išsilavinimas**

2004-2008 Biochemijos bakalauras, Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)  
2008-2010 Biochemijos magistras, Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)

**Darbo patirtis** Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto  
Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius

2007-2010 Laborantas  
2010-2014 Biologas tyrėjas  
2014-dabar Jaunesnysis mokslo darbuotojas

## **PADĖKA**

Esu labai dėkingas doktorantūros darbo vadovui prof. Virginijui Šikšniui už galimybę dirbti BNSTS laboratorijoje, už suteiktą tarpdisciplininę temą, už vertingas diskusijas, motyvaciją ir už kasmetines organizuojamas laboratorijos išvykas.

Esu labai dėkingas doktorantūros darbo vadovui dr. G. Sasnauskui už vadovavimą, vertingas diskusijas, kritines pastabas bei pagalbą rengiant publikacijas ir disertaciją.

Dėkoju prof. R. Seidel (Leipcigo universitetas) už suteiktą galimybę atlikti pavienių molekulių eksperimentus jo vadovaujamoje „Variklinių baltymų“ laboratorijoje, Drezdeno technikos ir Miunsterio universitetuose.

Esu labai dėkingas dr. J. Dikić (Leipcigo universitetas) už pagalbą ir suteiktus įgūdžius atliekant pavienių molekulių eksperimentus, analizuojant duomenis ir už DNR konstruktus. Taip pat dėkoju dr. F.W. Schwarz (Drezdeno technikos universitetas) už pirmąsias pavienių molekulių eksperimentų pamokas.

Dėkoju savo bakalaurnio ir magistrinio darbo vadovei dr. G. Tamulaitienei už suteiktus pirmuosius darbo įgūdžius ir vadovavimą.

Esu labai dėkingas dr. A. Šilanskui už pagalbą atliekant pirmuosius BcnI fluorescencinio žymėjimo eksperimentus ir už gerą nuotaiką mūsų kabinete.

Dėkoju visiems savo kolegoms už vertingas diskusijas ir motyvaciją.

Esu labai dėkingas savo chemijos mokytojai L. Kvedaravičienei už sudominimą chemijos mokslu bei motyvaciją studijuoti biochemiją.

Dėkoju visiems savo šeimos nariams už palaikymą ir motyvaciją, ypač žmonai Ingridai ir mamai Olgai.

## SUMMARY

Type II restriction enzymes (REases) form one of the largest groups of site-specific DNA-acting enzymes. They recognize short (4-8 bp) DNA sequences and cleave both DNA strands within or close to the recognition sites. REases are part of restriction-modification (R – M) systems that protect host bacteria and archaea cells from foreign (e.g. bacteriophage) DNA (Pingoud et al., 2014). For example, studies performed on REases have contributed to our understanding of facilitated diffusion, i.e. target site location mechanism employed by most site-specific proteins involving sliding and hopping (Halford, 2004). Of particular interest are studies that examine the relationship between formation of a specific REase complex with the target site(s), enzyme activation and mechanisms of DNA cleavage (Kurpiewski et al., 2004). Indeed, despite a similar function – DNA cleavage at specific sites – REases are a highly heterogeneous group of enzymes that differ in their oligomeric structure, domain organization, recognition sites, and reaction mechanisms.

BcnI is a monomeric REase, which forms an asymmetric complex with its pseudopalindromic recognition site 5'-CC/SGG-3' (where S is C or G, and '/' marks cleavage position), placing the single catalytic centre in the vicinity of the scissile phosphate in one of the two DNA strands (Sokolowska et al., 2007). This raised a question of how BcnI accomplishes cleavage of double stranded DNA, we have employed various biochemical and biophysical methods, including bulk kinetics and single-molecule techniques, to elucidate the target site location and DNA cleavage mechanisms of BcnI.

Bulk kinetic studies revealed that monomeric restriction endonuclease BcnI double-stranded DNA hydrolysis reaction can be divided into five steps: (i) rapid association of BcnI with the DNA substrate; (ii) rapid cleavage of the first DNA strand; (iii) slow switch in BcnI orientation on the DNA; (iv) rapid cleavage of the second DNA strand; and (v) rate limiting product release. Experiments revealed that BcnI cleaves both DNA strands of the specific site without dissociation, but liberates specific site after cleavage of the first strand and escapes to non-specific DNA. In addition, structural data revealed, that switch in the orientation (iii) is impossible without conformational changes of BcnI subdomains.

To reveal additional details of the monomeric restriction endonuclease BcnI double-stranded DNA hydrolysis reaction, we performed additional experiments employing various single molecule techniques. FRET experiments with confocal microscope using fluorescently double-labelled BcnI, revealed that DNA-binding cleft, formed by the catalytic and DNA recognition subdomains of apo-BcnI is flexible; but divalent metal ions bring the catalytic and the recognition subdomains into close proximity. Another experiment with fluorescently single-labelled BcnI, revealed that BcnI preferentially binds specific DNA and possess active site to strand with the central G nucleotide (5'-CCSGG-3). Experiments on stretched DNA employing TIRF-tweezers setup, revealed that BcnI employs 'facilitated diffusion' for the target site location and for specific double strand-break completion. Single DNA molecule hydrolysis experiments revealed that BcnI cleaves DNA strands of the specific site sequentially. Summing up, we performed detailed study on

the double-stranded DNA hydrolysis reaction mechanism by monomeric restriction enzyme BcnI.

# LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. van Aelst, K., Toth, J., Ramanathan, S.P., Schwarz, F.W., Seidel, R., and Szczelkun, M.D. (2010). Type III restriction enzymes cleave DNA by long-range interaction between sites in both head-to-head and tail-to-tail inverted repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 9123–9128.
2. Armalyte, E., Bujnicki, J.M., Giedriene, J., Gasiunas, G., Kosinski, J., and Lubys, A. (2005). Mva1269I: A Monomeric Type IIS Restriction Endonuclease from *Micrococcus Varians* with Two EcoRI- and FokI-like Catalytic Domains. *J. Biol. Chem.* *280*, 41584–41594.
3. Bagchi, B., Blainey, P.C., and Xie, X.S. (2008). Diffusion Constant of a Nonspecifically Bound Protein Undergoing Curvilinear Motion along DNA †. *J. Phys. Chem. B* *112*, 6282–6284.
4. Bellamy, S.R.W., Milsom, S.E., Scott, D.J., Daniels, L.E., Wilson, G.G., and Halford, S.E. (2005). Cleavage of Individual DNA Strands by the Different Subunits of the Heterodimeric Restriction Endonuclease BbvCI. *J. Mol. Biol.* *348*, 641–653.
5. Bonnet, I., and Desbiolles, P. (2011). The diffusion constant of a labeled protein sliding along DNA. *Eur. Phys. J. E* *34*, 25.
6. Bonnet, I., Biebricher, A., Porte, P.-L., Loverdo, C., Benichou, O., Voituriez, R., Escude, C., Wende, W., Pingoud, A., and Desbiolles, P. (2008). Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA. *Nucleic Acids Res.* *36*, 4118–4127.
7. Catto, L.E., Bellamy, S.R.W., Retter, S.E., and Halford, S.E. (2008). Dynamics and consequences of DNA looping by the FokI restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res.* *36*, 2073–2081.
8. Daldrop, P., Brutzer, H., Huhle, A., Kauert, D.J., and Seidel, R. (2015). Extending the Range for Force Calibration in Magnetic Tweezers. *Biophys. J.* *108*, 2550–2561.
9. Deibert, M. (1999). Crystal structure of MunI restriction endonuclease in complex with cognate DNA at 1.7 Å resolution. *EMBO J.* *18*, 5805–5816.
10. Dikic, J., Menges, C., Clarke, S., Kokkinidis, M., Pingoud, A., Wende, W., and Desbiolles, P. (2012). The rotation-coupled sliding of EcoRV. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4064–4070.
11. Embleton, M.L., Siksnys, V., and Halford, S.E. (2001). DNA cleavage reactions by type II restriction enzymes that require two copies of their recognition sites. *J. Mol. Biol.* *311*, 503–514.
12. Gasiunas, G., Sasnauskas, G., Tamulaitis, G., Urbanke, C., Razaniene, D., and Siksnys, V. (2008). Tetrameric restriction enzymes: expansion to the GIY-YIG nuclease family. *Nucleic Acids Res.* *36*, 938–949.
13. Gorman, J., Chowdhury, A., Surtees, J.A., Shimada, J., Reichman, D.R., Alani, E., and Greene, E.C. (2007). Dynamic Basis for One-Dimensional DNA Scanning by the Mismatch Repair Complex Msh2-Msh6. *Mol. Cell* *28*, 359–370.
14. Gorman, J., Plys, A.J., Visnapuu, M.-L., Alani, E., and Greene, E.C. (2010).



- Visualizing one-dimensional diffusion of eukaryotic DNA repair factors along a chromatin lattice. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 932–938.
15. Gowers, D.M., and Halford, S.E. (2003). Protein motion from non-specific to specific DNA by three-dimensional routes aided by supercoiling. *EMBO J.* *22*, 1410–1418.
  16. Gowers, D.M., Wilson, G.G., and Halford, S.E. (2005). Measurement of the contributions of 1D and 3D pathways to the translocation of a protein along DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15883–15888.
  17. Granéli, A., Yeykal, C.C., Robertson, R.B., and Greene, E.C. (2006). Long-distance lateral diffusion of human Rad51 on double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 1221–1226.
  18. Gust, A., Zander, A., Gietl, A., Holzmeister, P., Schulz, S., Lalkens, B., Tinnefeld, P., and Grohmann, D. (2014). A Starting Point for Fluorescence-Based Single-Molecule Measurements in Biomolecular Research. *Molecules* *19*, 15824–15865.
  19. Halford, S.E. (2004). How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res.* *32*, 3040–3052.
  20. Harada, Y., Funatsu, T., Murakami, K., Nonoyama, Y., Ishihama, A., and Yanagida, T. (1999). Single-Molecule Imaging of RNA Polymerase-DNA Interactions in Real Time. *Biophys. J.* *76*, 709–715.
  21. Hohlbein, J., Craggs, T.D., and Cordes, T. (2014). Alternating-laser excitation: single-molecule FRET and beyond. *Chem. Soc. Rev.* *43*, 1156–1171.
  22. Huhle, A., Klaue, D., Brutzer, H., Daldrop, P., Joo, S., Otto, O., Keyser, U.F., and Seidel, R. (2015). Camera-based three-dimensional real-time particle tracking at kHz rates and Ångström accuracy. *Nat. Commun.* *6*, 5885.
  23. Kelly, T.J., and Smith, H.O. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. II. *J. Mol. Biol.* *51*, 393–409.
  24. Kemmerich, F.E., Swoboda, M., Kauert, D.J., Grieb, M.S., Hahn, S., Schwarz, F.W., Seidel, R., and Schlierf, M. (2015). Simultaneous single-molecule force and fluorescence sampling of DNA nanostructure conformations using magnetic tweezers. *Nano Lett.* *acs.nanolett.5b03956*.
  25. Kemmerich, F.E., Kasaciunaite, K., and Seidel, R. (2016). Modular magnetic tweezers for single-molecule characterizations of helicases. *Methods* *108*, 4–13.
  26. Kim, J.H., and Larson, R.G. (2007). Single-molecule analysis of 1D diffusion and transcription elongation of T7 RNA polymerase along individual stretched DNA molecules. *Nucleic Acids Res.* *35*, 3848–3858.
  27. Kim, Y.C., Grable, J.C., Love, R., Greene, P.J., and Rosenberg, J.M. (1990). Refinement of Eco RI endonuclease crystal structure: a revised protein chain tracing. *Science* *249*, 1307–1309.
  28. Kolesov, G., Wunderlich, Z., Laikova, O.N., Gelfand, M.S., and Mirny, L. a (2007). How gene order is influenced by the biophysics of transcription regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 13948–13953.
  29. Komazin-Meredith, G., Mirchev, R., Golan, D.E., van Oijen, A.M., and Coen, D.M.

- (2008). Hopping of a processivity factor on DNA revealed by single-molecule assays of diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 10721–10726.
30. Kostiuk, G., Sasnauskas, G., Tamulaitiene, G., and Siksnys, V. (2011). Degenerate sequence recognition by the monomeric restriction enzyme: single mutation converts BcnI into a strand-specific nicking endonuclease. *Nucleic Acids Res.* *39*, 3744–3753.
  31. Lakowicz, J.R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Boston, MA: Springer US).
  32. Laurence, T. a., Kwon, Y., Johnson, A., Hollars, C.W., O'Donnell, M., Camarero, J. a., and Barsky, D. (2008). Motion of a DNA Sliding Clamp Observed by Single Molecule Fluorescence Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* *283*, 22895–22906.
  33. Laurens, N., Bellamy, S.R.W., Harms, A.F., Kovacheva, Y.S., Halford, S.E., and Wuite, G.J.L. (2009). Dissecting protein-induced DNA looping dynamics in real time. *Nucleic Acids Res.* *37*, 5454–5464.
  34. Loverdo, C., Bénichou, O., Voituriez, R., Biebricher, a., Bonnet, I., and Desbiolles, P. (2009). Quantifying hopping and jumping in facilitated diffusion of DNA-binding proteins. *Phys. Rev. Lett.* *102*, 1–4.
  35. Otto, O., Czerwinski, F., Gornall, J.L., Stober, G., Oddershede, L.B., Seidel, R., and Keyser, U.F. (2010). Real-time particle tracking at 10,000 fps using optical fiber illumination. *Opt. Express* *18*, 22722.
  36. Pingoud, A. (2004). *Restriction Endonucleases* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).
  37. Pingoud, A., Fuxreiter, M., Pingoud, V., and Wende, W. (2005). Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 685–707.
  38. Ramanathan, S.P., van Aelst, K., Sears, A., Peakman, L.J., Diffin, F.M., Szczelkun, M.D., and Seidel, R. (2009). Type III restriction enzymes communicate in 1D without looping between their target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 1748–1753.
  39. Roy, R., Hohng, S., and Ha, T. (2008). A practical guide to single-molecule FRET. *Nat. Methods* *5*, 507–516.
  40. Ruhnnow, F., Zwicker, D., and Diez, S. (2011). Tracking Single Particles and Elongated Filaments with Nanometer Precision. *Biophys. J.* *100*, 2820–2828.
  41. Rutkauskas, M., Sinkunas, T., Songailiene, I., Tikhomirova, M., Siksnys, V., and Seidel, R. (2015). Directional R-loop formation by the CRISPR-cas surveillance complex cascade provides efficient off-target site rejection. *Cell Rep.* *10*, 1534–1543.
  42. Sambrook, J., E. F., F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).
  43. Sapranuskas, R., Sasnauskas, G., Lagunavicius, A., Vilkaitis, G., Lubys, A., and Siksnys, V. (2000). Novel Subtype of Type IIs Restriction Enzymes: BfiI ENDONUCLEASE EXHIBITS SIMILARITIES TO THE EDTA-RESISTANT NUCLEASE Nuc OF SALMONELLA TYPHIMURIUM. *J. Biol. Chem.* *275*, 30878–30885.
  44. Sasnauskas, G., Jeltsch, A., Pingoud, A., and Siksnys, V. (1999). Plasmid DNA Cleavage by Mun I Restriction Enzyme: Single-Turnover and Steady-State Kinetic

- Analysis †. *Biochemistry* 38, 4028–4036.
45. Sasnauskas, G., Zakrys, L., Zaremba, M., Cosstick, R., Gaynor, J.W., Halford, S.E., and Siksny, V. (2010). A novel mechanism for the scission of double-stranded DNA: BfiI cuts both 3'–5' and 5'–3' strands by rotating a single active site. *Nucleic Acids Res.* 38, 2399–2410.
  46. Sasnauskas, G., Kostiuk, G., Tamulaitis, G., and Siksny, V. (2011). Target site cleavage by the monomeric restriction enzyme BcnI requires translocation to a random DNA sequence and a switch in enzyme orientation. *Nucleic Acids Res.* 39, 8844–8856.
  47. Schneider, C. a, Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
  48. Schurr, J.M. (1979). The one-dimensional diffusion coefficient of proteins absorbed on DNA. Hydrodynamic considerations. *Biophys. Chem.* 9, 413–414.
  49. Schwarz, F.W., Toth, J., van Aelst, K., Cui, G., Clausing, S., Szczelkun, M.D., and Seidel, R. (2013). The Helicase-Like Domains of Type III Restriction Enzymes Trigger Long-Range Diffusion Along DNA. *Science* (80-. ). 340, 353–356.
  50. Siksny, V., Skirgaila, R., Sasnauskas, G., Urbanke, C., Cherny, D., Grazulis, S., and Huber, R. (1999). The Cfr10I restriction enzyme is functional as a tetramer. *J. Mol. Biol.* 291, 1105–1118.
  51. Slutsky, M., and Mirny, L. a (2004). Kinetics of Protein-DNA Interaction: Facilitated Target Location in Sequence-Dependent Potential. *Biophys. J.* 87, 4021–4035.
  52. Sokolowska, M., Kaus-Drobek, M., Czapinska, H., Tamulaitis, G., Szczepanowski, R.H., Urbanke, C., Siksny, V., and Bochtler, M. (2007). Monomeric Restriction Endonuclease BcnI in the Apo Form and in an Asymmetric Complex with Target DNA. *J. Mol. Biol.* 369, 722–734.
  53. Stanford, N.P. (2000). One- and three-dimensional pathways for proteins to reach specific DNA sites. *EMBO J.* 19, 6546–6557.
  54. Stryer, L. (1978). Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 819–846.
  55. Tamulaitis, G., Mucke, M., and Siksny, V. (2006). Biochemical and mutational analysis of Eco RII functional domains reveals evolutionary links between restriction enzymes. *FEBS Lett.* 580, 1665–1671.
  56. Theissen, B., Karow, A.R., Kohler, J., Gubaev, A., and Klostermeier, D. (2008). Cooperative binding of ATP and RNA induces a closed conformation in a DEAD box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 548–553.
  57. Wang, Y.M., Austin, R.H., and Cox, E.C. (2006). Single Molecule Measurements of Repressor Protein 1D Diffusion on DNA. *Phys. Rev. Lett.* 97, 48302.
  58. Wilkins, D.K., Grimshaw, S.B., Receveur, V., Dobson, C.M., Jones, J. a., and Smith, L.J. (1999). Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques. *Biochemistry* 38, 16424–16431.
  59. Wright, D.J., Jack, W.E., and Modrich, P. (1999). The kinetic mechanism of EcoRI endonuclease. *J. Biol. Chem.* 274, 31896–31902.

60. Zaremba, M., Sasnauskas, G., Urbanke, C., and Siksnyš, V. (2005). Conversion of the Tetrameric Restriction Endonuclease Bse634I into a Dimer: Oligomeric Structure–Stability–Function Correlations. *J. Mol. Biol.* 348, 459–478.
61. Zaremba, M., Owsicka, A., Tamulaitis, G., Sasnauskas, G., Shlyakhtenko, L.S., Lushnikov, A.Y., Lyubchenko, Y.L., Laurens, N., van den Broek, B., Wuite, G.J.L., et al. (2010). DNA synapsis through transient tetramerization triggers cleavage by Ecl18kI restriction enzyme. *Nucleic Acids Res.* 38, 7142–7154.
62. Zheng, L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32, e115–e115.