

**VILNIAUS UNIVERSITETAS**

**Paulius Toliušis**

**Netipinės nuo ATP priklausomos restrikcijos  
endonukleazės CgII struktūros ir funkcijos ryšys**

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

**Vilnius, 2018**

Disertacija rengta 2013-2017 m. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos institute.

**Mokslinis vadovas** – dr. **Mindaugas Zaremba** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P).

**Disertacija ginama viešame disertacijos gynimo tarybos posėdyje:**

**Pirmininkas** – prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

**Nariai:**

Prof. dr. **Rolandas Meškys** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Dr. **Rūta Gerasimaitė** (Max Planck biofizikinės chemijos institutas, Vokietija, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Prof. dr. **Saulius Serva** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Prof. dr. **Kęstutis Sužiedėlis** (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Disertacija bus ginama viešame disertacijos Gynimo tarybos posėdyje 2018 m. rugsėjo 20 d. 10 val. Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje.  
Adresas: Saulėtekio al. 7, LT-10257, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiųsta 2018 m. rugpjūčio 20 d.  
Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir Vilniaus universiteto interneto svetainėje adresu: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

**VILNIUS UNIVERSITY**

**Paulius Toliušis**

**Structure and function correlations within the atypical  
ATP-dependent restriction endonuclease CgII**

Doctoral dissertation

Physical sciences, biochemistry (04 P)

**Vilnius, 2018**

The work presented in this doctoral dissertation has been carried out at the Institute of Biotechnology, Life Sciences Centre of Vilnius University during 2013-2017 m.

**Scientific Supervisor** – dr. **Mindaugas Zaremba** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

**The dissertation will be defended at the public meeting before defence committee**

**Chairman** – prof. dr. **Daumantas Matulis** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

**Members:**

Prof. dr. **Rolandas Meškys** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Dr. **Rūta Gerasimaitė** (Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Germany, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Prof. dr. **Saulius Serva** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

Prof. dr. **Kęstutis Sužiedėlis** (Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

The thesis defence will take place at the Vilnius University, Life Sciences Centre (auditorium R401, Saulėtekio av. 7, LT-10257, Vilnius, Lithuania) at 10:00 on 20<sup>th</sup> of September, 2018.

The summary of doctoral dissertation was sent on 20<sup>th</sup> of August, 2018.  
The thesis is available at the Library of Vilnius University and at the Vilnius University internet link: <https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendarius>

# TURINYS

<b>TURINYS</b> .....	<b>5</b>
<b>SANTRUMPŲ SĄRAŠAS</b> .....	<b>6</b>
<b>ĮVADAS</b> .....	<b>7</b>
<b>TYRIMŲ METODIKA</b> .....	<b>9</b>
<b>REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	<b>20</b>
<b>1. CgII restrikcijos-modifikacijos sistema iš <i>C. glutamicum</i> kamieno</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Spėjimų restrikcijos endonuklezės ir ATPazės subvienetų iš CgII RM sistemos     charakterizavimas</b> .....	<b>21</b>
2.1. R.CgII ir H.CgII baltymų ir jų domenų raiška ir gryninimas.....	21
2.2. CgII baltymų ir jų domenų oligomerinės būsenos nustatymas.....	21
2.3. CgII baltymų susirišimas su DNR.....	22
2.4. ATP hidrolizės tyrimai.....	22
2.5. DNR hidrolizės tyrimai.....	24
2.6. Funkcinis CgII kompleksas.....	26
<b>3. Nuo ATP priklausomos CgII restrikcijos endonuklezės DNR hidrolizės     mechanizmo tyrimas</b> .....	<b>27</b>
3.1. CgII naudoja vienmatę difuziją DNR hidrolizei.....	27
3.2. CgII naudoja dvikryptės DNR translokacijos mechanizmą.....	31
3.3. CgII pasižymi translokaziniu aktyvumu <i>in trans</i> susidarant baltymų-DNR kompleksams.....	32
3.4. Spėjamas CgII veikimo mechanizmas.....	35
<b>4. Biocheminiai ir struktūriniai H.CgII subvieneto tyrimai</b> .....	<b>35</b>
4.1. C-galinio domeno kristalinė struktūra.....	36
4.2. Struktūrinis helikazinio variklio DEAD-Z1 modelis.....	37
4.3. Helikazinių motyvų mutageninė analizė.....	38
4.4. H.CgII subvieneto domenų aktyvumo tyrimai.....	41
<b>IŠVADOS</b> .....	<b>44</b>
<b>MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS</b> .....	<b>45</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	<b>46</b>
<b>PADĖKA</b> .....	<b>47</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>48</b>
<b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....	<b>49</b>

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AMP-PNP	adenilil-imidodifosfatas
Ap <sup>r</sup>	atsparumas ampicilinui
ar.	aminorūgštis
bp	bazių pora (-os)
Cas	angl. CRISPR associated
Cascade	angl. CRISPR-associated complex for antiviral defence
Cm <sup>r</sup>	atsparumas chloramfenikoliui
CRISPR	angl. clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNR	CRISPR RNR
(d)NTP	(deoksi) nukleotido trifosfatas
DTT	ditiotreitolis
EDTA	etilendiamintetraacto rūgštis
EMSA	elektroforezinio judrumo poslinkio metodas
HtH	CgII taikiniai (5'-GCCGC-3') nukreipti vienas į kitą
HtT	CgII taikiniai (5'-GCCGC-3') nukreipti į tą pačią pusę
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozidas
JSA	jaučio serumo albuminas
Kn <sup>r</sup>	atsparumas kanamicinui
LB	Luria-Bertani mitybinė terpė
Mant-ATP	2/3'- <i>O</i> -( <i>N</i> -metilantraniloil) adenzino 5'-trifosfatas
MES	2-( <i>N</i> -morfolino)etansulfoninė rūgštis
MOPS	3-( <i>N</i> -morfolino)propansulfoninė rūgštis
NDS	natrio dodecilsulfatas
nt	nukleotidas (-ai)
OD <sub>600</sub>	optinis tankis esant 600 nm bangos ilgiui
PDB	baltymų duomenų bankas
PEG	polietilenglikolis
PLD	fosfolipazės D domenas
PNK	polinukleotido kinazė
PAGE	poliakrilamidinio gelio elektroforezė
PGR	polimerazės grandininė reakcija
RM	restrikcijos-modifikacijos
SAM	S-adenozil-L-metioninas
SAXS	mažo kampo Rentgeno spindulių sklaida
TFO	tripleksą formuojantis oligonukleotidas
TtT	CgII taikiniai (5'-GCCGC-3') nukreipti į priešingas puses
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletilendiaminas
TLC	plonasluoksnė chromatografija
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diolis
wt	laukinis tipas

# IVADAS

Restrikcijos-modifikacijos (RM) sistemos apsaugo bakterijų ir archėjų ląsteles nuo „svetimos“ DNR invazijos (pvz.: fago ar plazmidinės DNR) (Pingoud ir kt., 2014). RM sistemas paprastai sudaro du fermentai: restrikcijos endonukleazė (REazė) ir DNR metiltransferazė (MTazė). Metiltransferazė modifikuoja DNR taikinius ir taip apsaugo ląstelės-šeimininkės DNR nuo savų endonukleazių poveikio. Patekusios į ląstelę „svetimos“ DNR neturi apsaugotų restrikcijos endonukleazių taikinių, todėl ląstelės restrikcijos endonukleazės jas sukarmo. Pagal struktūrinę organizaciją, subvienetų sudėtį, kofaktorių poreikį ir veikimo mechanizmus, RM sistemos yra skirstomos į keturis klasikinius tipus: I, II, III ir IV tipus (Roberts ir kt., 2003). II tipo restrikcijos fermentai atpažįsta trumpas, paprastai 4-8 bp palindromines sekas ir kerpa DNR fiksuotose pozicijose atpažinimo sekose ar greta jų. Jos skiriasi nuo I, III ir IV tipo restrikcijos fermentų keliais bruožais. Pagrindinis skirtumas yra tas, kad daugumai II tipo restrikcijos fermentų kirpimui nėra reikalinga adenozino trifosfato (ATP) hidrolizė (Pingoud ir kt., 2014). Priešingai, I, III ir IV tipo RM sistemų fermentai naudoja ATP arba GTP hidrolizę, kad įvyktų sąveika tarp dviejų nutolusių fermentų, esančių ant DNR molekulės, tuomet DNR yra perkerpama fiksuotose arba nefiksuotose pozicijose, šalia arba gana toli nuo DNR atpažinimo taikinio (Loenen ir kt., 2014b; Loenen ir kt., 2014a; Rao ir kt., 2014).

Mūsų tyrimo objektas yra RM sistema CgII iš *Corynebacterium glutamicum* kamieno, kuri negali būti priskirta konkrečiam restrikcijos modifikacijos tipui. Šiame darbe mes parodėme, kad CgII restrikcijos endonukleazė yra sudaryta iš dviejų baltymų, R.CgII ir H.CgII. Mes charakterizavome šiuos baltymus panaudodami įvairius biocheminius, struktūrinius metodus, bei pasiūlėme galimą CgII restrikcijos endonukleazės veikimo mechanizmą, kuris skiriasi nuo kitų charakterizuotų ATP naudojančių RM fermentų veikimo mechanizmų.

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

1. Biochemiškai charakterizuoti spėjamos ATPazės subvienetą H.CgII iš CgII RM sistemos.
2. Biochemiškai charakterizuoti spėjamos restrikcijos endonukleazės subvienetą R.CgII iš CgII RM sistemos ir nustatyti dvigrandinės DNR hidrolizės veikimo mechanizmą.
3. Nustatyti spėjamos ATPazės subvieneto H.CgII struktūrinius motyvus ir jų vaidmenį ATP/DNR surišime bei hidrolizėje.

## **Mokslinis naujumas:**

Mes pirmieji parodėme, kad H.CgII yra efektyvi ATPazė, kurios ATP hidrolizės greitis yra panašus į I tipo RM fermentų ATP hidrolizės greitį. Mes taip pat pirmieji pateikėme struktūrinius ir biocheminius įrodymus, rodančius, kad H.CgII subvieneto DEAD-Z1 domenai formuoja ATP surišimo kišenę ir yra iki šiol neaprašytas monomerinis į helikazes panašus variklis. Be to, mes nustatėme CgII C-galinio domeno erdvinę struktūrą, turinčią unikalią sanklodą, ir pirmieji pateikėme eksperimentinius įrodymus, rodančius, kad R.CgII subvienetas hidrolizuoja DNR. Mes parodėme, kad R.CgII ir H.CgII subvienetai sudaro heterotetramerinį  $R_2H_2$ .CgII kompleksą. Mes taip pat

pasiūlėme šio komplekso DNR hidrolizės mechanizmą, kuris skiriasi nuo kitų charakterizuotų ATP naudojančių restrikcijos fermentų veikimo mechanizmų.

### **Praktinė reikšmė:**

Restrikcijos fermentai, kerpatys DNR fiksuotose pozicijose šalia atpažinimo sekų, yra plačiai naudojami kaip molekulinės žirkės biotechnologijoje, norint klonuoti genus ar atlikti kitas DNR manipuliacijas. Kai kurie iš jų, įskaitant ir CgII, naudoja DNR slinkimo mechanizmą, kuris gali pagreitinti dvigrandinio trūkio įvedimą norimoje DNR molekulėje. Be to, CgII restrikcijos endonukleazės gebėjimas išardyti DNR tripleksų struktūras ar nustumti stipriai prisijungusius baltymus nuo DNR gali leisti reguliuoti genų raišką, DNR metabolizmą, genų stabilumą ląstelėse. Taip pat ši savybė gali būti panaudota norint pašalinti prie DNR prisijungusius baltymus, kurie buvo panaudoti genų terapijos ar kitais biomedicinos tikslais.

### **Ginamieji disertacijos teiginiai:**

1. Restrikcijos endonukleazės subvienetas R.CgII pasižymi nukleaziniu aktyvumu, kuris griežtai priklauso nuo aktyvios ATPazės subvieneto H.CgII ir ATP.
2. ATPazės subvienetas H.CgII pasižymi ATPaziniu aktyvumu, kuris griežtai priklauso nuo restrikcijos endonukleazės subvieneto R.CgII ir dvigrandinės DNR.
3. H.CgII subvienetas turi iki šiol neaprašytą monomerinį į helikazes panašų molekulinį variklį.
4. Dvigrandinės DNR perkirpimui CgII restrikcijos endonukleazė naudoja nuo ATP priklausomą DNR translokacijos mechanizmą.
5. CgII translokazinis aktyvumas gali būti perkeltas nuo vienos DNR molekulės ant kitos.



# TYRIMŲ METODIKA

## Reagentai

Visos šiame darbe naudotos aukščiausio laipsnio grynumo cheminės medžiagos buvo įsigytos iš „Sigma-Aldrich“, „Thermo Fisher Scientific“, „Roth“, „Perkin Elmer“, „Hartmann Analytic“, „Fluka“ ir „Difco“. Darbe naudoti fermentai: DNR polimerazės, T4 DNR ligazė, T4 polinukleotido kinazė (PNK), jaučio serumo albuminas (JSA), FastDigest restrikcijos endonukleazės įsigytos iš „Thermo Fisher Scientific“. Kreatino kinazė pirktas iš „Sigma-Aldrich“.

## Molekulinės biologijos rinkiniai

„CloneJET PCR Cloning Kit“, „GeneJET Gel Extraction Kit“, „Rapid DNA Ligation Kit“, „GeneJET PCR Purification Kit“, „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ įsigyti iš „Thermo Fisher Scientific“. „Malachite Green Phosphate Assay Kit“ rinkinys gautas iš „BioAssay Systems“. „QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ pirktas iš „Agilent Technologies“. „Gel Filtration Calibration Kit“ įsigytas iš „GE Healthcare“. Rinkiniai naudoti laikantis gamintojo rekomendacijų.

## Buferiai ir tirpalai

**Baltymų gryninimo buferiai:** Buferis 1 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 1 M NaCl, 25 mM imidazolo, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 2 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 1 M NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 3 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 100 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 4 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 50 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 5 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 300 mM NaCl, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 6 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 500 mM NaCl, 5 % (v/v) glicerolio; Buferis 7 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 1 M NaCl, 500 mM imidazolo, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 8 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 1 M NaCl, 2,5 mM destiobiotino, 5 mM 2-merkaptioetanolio; Buferis 9 – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 500 mM NaCl, 500 mM imidazolo, 5 % (v/v) glicerolio; **Gelfiltracijos buferis** – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 300 mM NaCl ir 5 mM 2-merkaptioetanolio; **TLC buferis** – 325 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 3,5 esant 25 °C); **DNR užnešimo tirpalas 1** – 75 mM EDTA, 0,025% (w/v) bromfenolio mēlio, 0,3% (w/v) NDS, 50% (v/v) glicerolio, pH 8,0 esant 25°C; **DNR užnešimo tirpalas 2** – 75 mM EDTA, 0,6% (w/v) orangeG dažo, 0,5% (w/v) NDS, 50% (v/v) glicerolio, pH 8,0 esant 25°C; **G SMB buferis** – 250 mM MOPS (pH 5,5 esant 25°C), 15% (w/v) gliukozės, 3% (w/v) NDS, 0,4 mg/ml bromfenolio mēlio; **Triplekso formavimo „MM“ buferis** – 10 mM MES (pH 5,5 esant 25°C), 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>; **Reakcijos buferis 1** – 33 mM Tris-acetato (pH 7,0 esant 25°C), 10 mM Mg-acetato, 150 mM K-acetato, 0,1 mg/ml JSA; **Reakcijos buferis 2** – 33 mM Tris-acetato (pH 7,0 esant 25°C), 10 mM Mg-acetato, 150 mM K-acetato, 1 mM DTT, 4 mM ATP, 0,1 mg/ml JSA, 20 mM fosfokreatino, 5 U/ml kreatino kinazės; **Reakcijos buferis 3** – 33 mM Tris-acetato (pH 7,0 esant 25°C), 20 mM Mg-acetato, 1 mM DTT, 4 mM ATP, 0,1 mg/ml JSA, 20 mM fosfokreatino, 5 U/ml kreatino kinazės; **EMSA buferis 1** – 40 mM Tris, 20 mM acto rūgšties, 1 mM EDTA, pH 8,3 esant 25°C; **EMSA buferis 2** – 30 mM MES-His (pH 6,0 esant 25°C); **Saugojimo buferis 1** – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 400 mM KCl, 2 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% (v/v) glicerolio; **Saugojimo buferis 2** – 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 200 mM KCl,

2 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% (v/v) glicerolio; **Akrilamido tirpalas 1** – Akrilamido/N,N'–metilenbisakrilamido (37,5:1 (w/w)) tirpalas; **Akrilamido tirpalas 2** – Akrilamido/N,N'–metilenbisakrilamido (29:1 (w/w)) tirpalas; **PE1 buferis** – 375 mM Tris-HCl (pH 8,8 esant 25°C) ir 0,1% (w/v) NDS; **PE2 buferis** – 125 mM Tris-HCl (pH 6,8 esant 25°C) ir 0,1% (w/v) NDS; **PE3 buferis** – 25 mM Tris, 190 mM glicino ir 0,1% (w/v) NDS, pH 8,3 esant 25°C; **Baltymų užnešimo tirpalas** – 100 mM Tris-HCl (pH 6,8 esant 25°C), 4% (w/v) NDS, 20% (v/v) glicerolio, 200 mM DTT, 0,4 mg/ml bromfenolio mėlio; **NBE buferis** – 100 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH, 15 mM Na-acetato, 2 mM EDTA, pH 8,2 esant 25°C; **TFO leidimo buferis** – 40 mM Tris-acetato (pH 5,5 esant 25°C), 5 mM Na-acetato, 1 mM MgCl<sub>2</sub>.

### Bakterijų kamienai

*E. coli* kamienas ER2267 buvo naudotas klonavimo procedūroms. *E. coli* kamienai ER2566 ir BL-21 (DE3) buvo naudoti baltymų sintezei.

### DNR

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genomine DNR gauta iš „LGC standards“. Plazmidinės DNR, naudotos DNR manipuliacijoms ir eksperimentams, pateiktos 1 lentelėje.

#### 1 lentelė. Darbe naudotos plazmidinės DNR.

Pavadinimas	Komentaras
pBAD24	Plazmidinis vektorius naudotas R.CgII ir H.CgII baltymų klonavimui ir raiškai.
pETDuet	Plazmidinis vektorius naudotas R <sub>2</sub> H <sub>2</sub> .CgII komplekso klonavimui ir raiškai.
pLATE31	Plazmidinis vektorius naudotas R.CgII-B3, H.CgII-Z1, H.CgII-Z1-C ir H.CgII-C domenų klonavimui bei raiškai.
pLATE51	Plazmidinis vektorius naudotas H.CgII DEAD ir DEAD-Z1 domenų klonavimui bei raiškai.
pACYC184	Plazmidinis vektorius naudotas M.CgII geno klonavimui.
pBR322	Plazmidinis vektorius naudotas M.CgII geno klonavimui.
p0s	3105 bp plazmidinė DNR be CgII taikinių.
p1s	3105 bp plazmidinė DNR su vienu CgII taikiniu.
p1	4320 bp plazmidinė DNR su vienu CgII taikiniu.
p2_HtT	4320 bp plazmidinė DNR turinti du CgII taikinius išsidėsčiusius ta pačia kryptimi (HtT – angl. head-to-tail).
p2_HtT2	4320 bp plazmidinė DNR turinti du CgII taikinius išsidėsčiusius ta pačia kryptimi (HtT – angl. head-to-tail).
p2_TtT	4320 bp plazmidinė DNR turinti du CgII taikinius nukreiptus vienas į kitą (TtT – angl. tail-to-tail).
p2_cat	3108 + 1212 bp du CgII taikinius turintis katenanas.
pRMA03_0	4865 bp plazmidinė DNR su triplekso formavimo seka, bet neturinti CgII taikinių.
pRMA03_1	4865 bp plazmidinė DNR su triplekso formavimo seka ir turinti vieną CgII taikinį.
pRMA03_1_IN	4865 bp plazmidinė DNR su triplekso formavimo seka ir turinti vieną CgII taikinį.
pECFP-ICAD-S(NLS)	5556 bp plazmidinė DNR su triplekso formavimo seka.

## Oligonukleotidai

Visi darbe naudoti oligonukleotidai gauti iš „Metabion“ (2 lentelė). Oligonukleotidai buvo pažymėti 5'-gale naudojant PNK („Thermo Fisher Scientific“, Vilnius, Lietuva) ir  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$  („Perkin Elmer“) bei suldyti su nežymėtos komplementarios DNR pertekliumi.

**2 lentelė. Darbe naudoti oligonukleotidai.**

Pavadinimas	Seka 5'→3'	DNR matrica	Komentaras	
<u>Oligonukleotidai baltymų mutagenizei:</u>				
MZ-426	CGATTGCGTTATGCCGGCAAATCTATCTTTTCC ACAAGAACC	pETDuet_Strep- RH.CglI-His	H105A mutacijos įvedimas HxK motyve.	
MZ-427	GATAGATTTTGCCGGCATAACGCAATCGGGGAAT AACGAAC			
MZ-210	CATTATTGATGCCGCAGCAGATGCGACAAGTCTC AACAC	pBAD_H.CglI- His arba pETDuet_Strep- RH.CglI-His	D158A ir E159A mutacijų įvedimas DEAD motyve.	
MZ-211	CGCATCTGCTGCGGCATCAATAATGAGTACAGGG TG			
MZ-1132	GGTGAGGACTCCACAATTGGTATGGAAGCGATAA TCACC	pBAD_H.CglI- His arba pLATE31_H.CglI -C-His	R517E mutacijos įvedimas.	
MZ-1133	GTGCTTGTCTAAGTAGGCCAAGAGTTTTTTGTGCG AGTGC			
MZ-1134	CTCGCGACCTTCGAGGCTGCGCTTCTAGACTTTG AACG			
MZ-1135	GTCGAGATCGTTGGGGTCTACAGTAAAGCGTTG AGAATG		K539E mutacijos įvedimas.	
MZ-1130	CACTCGACGAAGAGCTCTTGGCCTATCTAGACAA GCAC			
MZ-1131	CTTCGACATTCTCGATTCTAGGATCCGCGGCAAA GTAG			
MZ-845	GCGACAAGTTTAAACACCAAAGCAAATCAGTCTG ATGTTTTCG		pBAD_H.CglI- His	V169A mutacijos įvedimas (L1 mutantas).
MZ-846	GACTGATTTGCTTTGGTGTTTAAACTTGTCGCAT CTGCTTCG			
MZ-719	GCAGATGCGACAAGTGCCAACACGGCAGCAAATC AGTCTGATGTTTTCGACC			L165A, K168A ir V169A mutacijų įvedimas (L3 mutantas).
MZ-720	CAGACTGATTTGCTGCCGTGTTGGCACTTGTCGC ATCTGCTTCGTCATCAATAATG			
MZ-755	GATGCGACAAGTGACGTCTCGACCATTAACCACC AGCTCAC	L165-S172 regiono delecija H.CglI baltyme ( $\Delta$ L mutantas).		
MZ-756	GGTTAATGGTCGAGACGTCACTTGTCGCATCTGC TTCGTCA			
<u>Oligonukleotidai naudoti triplekso nustūmimo eksperimentuose:</u>				
MZ-503	CTCCTCGAGCCCGGGTGA	pRMA03_0, pRMA03_1 ir pRMA03_1_IN	278 bp N, H ir T DNR fragmentų sintezė.	
MZ-504	CAATTCACACAGGAAACAGCTATGACC			
MZ-948	Biotin-CTCCTCGAGCCCGGGTGA	N	278 bp N fragmento su 5 gale biotinu sintezė.	
TFO	TTTCTTTCTTTTCTTCTTTCTT	–	Tripleksą formuojantis oligonukleotidas.	

2 lentelės tęsinys kitame puslapyje

## 2 lentelės tęsinys

<u>Oligonukleotidai naudoti ATPazinio aktyvumo tyrimuose:</u>			
MZ-317	CTTCGCCACCCCTAGGGGGAG	pECFP-ICAD-S(NLS)	281 bp H1 ir N1 DNR fragmentų sintezė.
MZ-318	TGGCAGGGCCTGCCGCC		281 bp H1 DNR fragmento sintezė.
MZ-320	TGGCAGGGCCTGCAGCCCCGACGTTG		281 bp N1 DNR fragmento sintezė.
<u>Oligonukleotidai sekvenavimui:</u>			
MZ-437	CACTCAAAGGCGGTAATACGG	p1	–
MZ-438	GAACTCTGTAGCACCGCC		
<u>Oligonukleotidų dupleksai:</u>			
R2-8/ R2-9	AATGGGCTCGCACGGCGGCTATTATCGATTGTA TTACCCGAGCGTGCCGCCGATAATAGCTAACAT	–	33 bp oligodupleksas (SP33) su CgII atpažinimo seka (pabraukta).
MZ-68/ MZ-69	AGATCGAAGACCGTAGCACTGGGCT TCTAGCTTCTGGCATCGTGACCCGA	–	25 bp oligodupleksas (NSP25) be CgII atpažinimo sekos.
E18-6/ E18-7	CGTAGCCTGGTCGATC GCATCGGACCAGCTAG	–	16 bp oligodupleksas (NSP16) be CgII atpažinimo sekos.
E18-8/ E18-9	CGTAGGCGGCTCGATC GCATCCGCCGAGCTAG	–	16 bp oligodupleksas (SP16) su CgII atpažinimo seka (pabraukta).

## Baltymų raiška ir gryninimas

*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genomine DNR naudota rekombinantinių genų R.CgII, H.CgII ir jų mutantų, bei minėtų baltymų pavienių domenų ir jų mutantų sintezei. Gauti genai įterpti į raiškos vektorius išreikti *E. coli* kamienuose ir išgryninti panaudojant skysčių chromatografiją (3 lentelė). Visų išgrynintų baltymų grynumas įvertintas naudojant NDS-PAGE ir gelio densitometriją. Tikslinių baltymų sekos patvirtintos masių spektrometrijos būdu. Baltymų koncentracijos (monomero) nustatytos matuojant absorbciją esant 280 nm bangos ilgiui ir panaudojant atitinkamą ekstinkcijos koeficientą (3 lentelė).

## Gelfiltracija

Gelfiltracija atlikta kambario temperatūroje (20±5°C) AKTA Avant sistema, panaudojant Superdex 200 HR kolonėlę (GE Healthcare), nulygsvarintą gelfiltracijos buferiu. Baltymų pavyzdžiai (10-20 μM) paruošti 100 μl gelfiltracijos buferyje. Baltymų elucija stebėta matuojant absorbciją ties 280 nm bangos ilgiu. Baltymų molekulinės masės paskaičiuotos remiantis žinomų baltymų standartų („Gel Filtration Calibration Kit“) elucijos tūriais.

## DNR manipuliacijos

DNR išskyrimas ir rekombinantinės DNR ruošimas. Standartiniai klonavimo metodai (Sambrook ir kt., 1989) naudoti rekombinantinių plazmidinių DNR paruošimui (1 lentelė). Plazmidinės DNR išgrynintos panaudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. DNR fragmentai išgryninti panaudojant „GeneJET PCR Purification Kit“. Visi

fermentai ir atitinkami buferiai naudoti DNR manipuliacijoms įsigyti iš „Thermo Fisher Scientific“.

Substratai DNR hidrolizės eksperimentams. Atviros žiedinės formos ir linijinės formos DNR substratai, turintys po vieną CgII atpažinimo seką, gauti iš p1 plazmidinės DNR, turinčios vieną CgII atpažinimo seką, ją paveikiant atitinkamai Cas9(H840A)-crRNR kompleksu arba NdeI restrikcijos endonukleaze (REaze). HtT1 ir HtT2 DNR fragmentai buvo gauti iš du CgII taikinius turinčios p2\_HtT plazmidinės DNR ją perkirpus atitinkamai su XhoI ir NdeI REazėmis. HtH ir HtT DNR fragmentai buvo gauti taip pat kaip ir HtT1 ir HtT2. HtN fragmentas gautas iš p1 plazmidinės DNR ją perkirpus su XhoI REaze, o susidarę 5' galai pažymėti su [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP ir PNK. Visi linijiniai ir atviros žiedinės formos substratai išgryninti panaudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinį.

Substratai triplekso nustūmimo eksperimentams. Trys skirtingi 278 bp N, H ir T fragmentai susintetinti PGR būdu panaudojant MZ-503 ir MZ-504 oligonukleotidinius pradmenis ir atitinkamai pRMA03\_0, pRMA03\_1 ir pRMA03\_1\_IN plazmidines DNR kaip matricas (2 lentelė). 5' gale biotiną turintis 278 bp N fragmentas gautas PGR būdu panaudojant MZ-948 ir MZ-504 oligonukleotidinius pradmenis ir anksčiau susintetintą N fragmentą kaip matricą (2 lentelė). 3383 bp CN plazmidinė DNR gauta įsiuvant 278 bp N fragmentą į plazmidinį p0s vektorių, paveiktą su EheI REaze. 3383 bp LN plazmidinė DNR gauta panaudojant CN plazmidinę DNR ir ją perkirpus CaiI REaze. L0 ir L1 fragmentai gauti iš atitinkamai p0s ir p1s plazmidinių DNR jas perkirpus su NdeI REaze. Visi PGR būdu gauti fragmentai išgryninti panaudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ rinkinį. 5' TFO galas pažymėtas su [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP ir PNK.

Mutagenezė. CgII mutantai gauti „QuikChange Site-Directed Mutagenesis“ metodu (Zheng ir kt., 2004) panaudojant atitinkamą DNR kaip matricą ir du oligonukleotidinius pradmenis (2 lentelė). Kompetentinės ląstelės paruoštos ir transformuotos gautomis DNR molekulėmis panaudojant CaCl<sub>2</sub> metodą (Sambrook ir kt., 1989). Tikslinių mutacijų įvedimas buvo patvirtintas sekvenuojant kiekvieno gauto mutanto pilno ilgio geną.

### **Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis (NDS) sąlygomis**

NDS-PAGE denatūruojančiomis sąlygomis buvo naudota išgrynintų baltymų grynumui įvertinti. Baltymų mėginiai buvo sumaišomi 1:1 (v/v) santykiu su baltymų užnešimo tirpalu ir atkaitinti prieš elektroforezę 5 min kaitinti 95°C. Buvo naudojami dviejų sluoksnių poliakrilamidiniai geliai (Sambrook ir kt., 1989). Skiriamąjį gelį sudarė 12% akrilamido tirpalas 1 ir PE1 buferis, o koncentruojantį – 4% akrilamido tirpalas 1 ir PE2 buferis. Gelio polimerizacija inicijuota pridėjus TEMED ir amonio peroksodisulfato. Elektroforezė vykdyta kambario temperatūroje 1-1,5 val. (~30 V/cm) PE3 buferyje. Geliai buvo dažomi „Page Blue“ („Thermo Fisher Scientific“, Vilnius, Lietuva) tirpalu. Baltymų santykiniai kiekiai įvertinti gelio densitometrijos būdu panaudojant gelių dokumentavimo BioDocAnalyze prietaisą (Biometra, Giotingenas, Vokietija), o gauti paveikslai apdoroti su OptiQuant 3,0 įrankiu (Packard Instrument).

### **Elektroforezė agaroziniame gelyje nedenatūruojančiomis sąlygomis**

Skirtingų DNR fragmentų ar skirtingų plazmidinės DNR topologinių formų frakcionavimas buvo vykdytas 1-2 val. (4 V/cm) 0,8-1,0% (w/v) agarozės geliuose NBE buferyje, turinčiame 0,5 µg/ml etidžio bromido. Prieš elektroforezę DNR mėginiai buvo

sumaišomi 1:1 (v/v) santykiu su DNR užnešimo tirpalais ir inkubuoti 70°C 15 min. Išfrakcionuotų DNR fragmentų santykiniai kiekiai įvertinti kaip aprašyta aukščiau.

DNR fragmentai, kurie buvo naudoti sekvenavimui, frakcionuoti 1-2 val. (4 V/cm) 1,0% (w/v) agarozės geliuose EMSA buferyje 1, neturiniame etidžio bromido. Prieš elektroforezę DNR mėginiai buvo sumaišomi 1:1 (v/v) santykiu su DNR užnešimo tirpalu 2 ir inkubuoti 75°C 15 min. Gelio juostelės, turinčios tikslinius DNR fragmentus, išpjautos remiantis etidžio bromidu dažytais standartiniais DNR fragmentų ilgiais. DNR išgryninta panaudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkinį.

### **Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje nedenatūruojančiomis sąlygomis**

Elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje nedenatūruojančiomis sąlygomis buvo naudojama DNR surišimo eksperimentuose (žr. 2.3.). Gelius sudarė 8% akrilamido tirpalas 2 ir EMSA buferiniai tirpalai. Gelio polimerizacija inicijuota pridėjus TEMED ir amonio peroksodisulfato.

DNR surišimo buferiai buvo paruošti iš atitinkamų EMSA buferių ir papildomai pridėdant 0,1 mg/ml JSA, 1 mM DTT ir 10% (v/v) glicerolio. Radioaktyvūs DNR mėginiai sumaišyti su atitinkamais DNR surišimo buferiais ir baltymais 96 apvaliadugnių šulinėlių plokštelėje, palikta 20-30 min. kambario temperatūroje, o po to mėginiai užnešti į gelį. Elektroforezė vykdyta 1-4 val. (6-8 V/cm) kambario temperatūroje. Po elektroforezės geliai buvo išdžiovinti po karšto oro srove. Radioaktyvi DNR nustatyta ir analizuota kaip aprašyta aukščiau.

### **Triplekso formavimas**

50 nM linijinės DNR ir 25 nM 5'-gale <sup>33</sup>P žymėto TFO (eksperimentams *in trans*: 10 nM linijinės arba plazmidinės DNR ir 5 nM <sup>33</sup>P žymėto TFO) sumaišyti triplekso formavimo „MM“ buferyje ir inkubuota per naktį 20°C temperatūroje. Susidarę tripleksai laikyti leduose, o prieš reakcijas ištirpinti santykiu 1/10 reakcijos buferyje 2.

### **TFO nustūmimo eksperimentai**

Triplekso nustūmimo reakcijos buvo atliekamos esant 20°C sumaišius suformuotą tripleksą reakcijos buferyje: 33 mM Tris-acetato (pH 7,0 esant 25°C), 0,1 mg/ml JSA (arba 1 mg/ml JSA reakcijoms su magnetinėmis dalelėmis), 1 mM DTT, 10 mM Mg-acetato, 150 mM K-acetato, 4 mM ATP arba AMP-PNP, 25 mM fosfokreatino ir 5 U/ml kreatino kinazės. Triplekso nustūmimo *in trans* reakcijose buvo papildomai pridėta 4, 10 arba 50 nM įvairių DNR. Reakcijos pradėtos pridėjus 200 nM H.CglI ir 200 nM R.CglI. Tam tikrais laiko intervalais iš reakcijų paimti mėginiai sumaišyti su 1:1 (v/v) GSMB buferiu. Susidarę produktai analizuoti 6-8% (w/v) poliakrilamidiniame arba 1% (w/v) agaroziniame gelyje. Elektroforezė vykdyta TFO leidimo buferyje atitinkamai 2 val. (~10 V/cm) esant 4°C arba 1 val. (~8 V/cm) esant 4°C. Triplekso santykinis kiekis kiekviename mėginyje paskaičiuotas pagal formulę:  $\text{kiekis}_{\text{triplekso}} / (\text{kiekis}_{\text{triplekso}} + \text{kiekis}_{\text{laisvo TFO}})$  (Firman ir kt., 2000). TFO nustūmimo greičiai gauti pritaikius funkciją triplekso nykimo vidurkinėms reikšmėms, paskaičiuotoms iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų (žr. duomenų analizę).

### **DNR surišimo eksperimentai**

DNR susirišimo su CglI baltymais analizė atlikta panaudojant elektroforetinio judrumo poslinkio metodą (angl. EMSA) EMSA buferiniuose tirpaluose. Susirišimui naudoti <sup>33</sup>P žymėti 33 bp specifinis (SP33) ir 25 bp nespecifinis (NSP25) DNR dupleksai

(2 lentelė). EMSA buferis 1 naudotas SP33 susirišimui su CgII baltymais, EMSA buferis 2 – NSP25 susirišimui su CgII baltymais.

DNR (galutinė konc. 1 arba 100 nM) su baltymais (galutinė konc. Nuo 1 to 5000 nM) inkubuota 20-30 min. kambario temperatūroje 10-20  $\mu$ l surišimo buferyje, pagamintame iš atitinkamų EMSA buferinių tirpalų. Laisva DNR ir baltymų-DNR kompleksai frakcionuoti poliakrilamidiniame gelyje nedenatūruojančiomis sąlygomis, o jų santykiniai kiekiai nustatyti kaip aprašyta aukščiau. Disociacijos konstantų  $K_d$  reikšmės paskaičiuotos pritaikius kvadratinę funkciją trims nepriklausomiems DNR susirišimo eksperimentams (žr. duomenų analizė).

### **Mant-ATP surišimo eksperimentai**

Didėjančios koncentracijos baltymų mėginiai (nuo 0,1 iki 15  $\mu$ M) buvo sumaišyti su reakcijos buferiu (20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl ir 1  $\mu$ M Mant-ATP) 10 mm kvarco kiuvetėje. Mant-ATP surišimo anizotropijos skaitinės reikšmės to paties mėginio buvo užrašomos 3-5 kartus iš eilės panaudojant FluoroMax-3 spektrofluorimetrą su Glan-Thompson poliarizatoriais (JY-Horiba Inc., New Jersey). Fluorescencijos anizotropijos matavimai atlikti kambario temperatūroje panaudojant du bangos ilgius ( $\lambda_{\text{žadinimo}} = 356$  nm ir  $\lambda_{\text{emisijos}} = 440$  nm). Disociacijos konstantų skaitinės reikšmės ( $K_d$ ) paskaičiuotos iš 3-5 skirtingų matavimų to paties mėginio ir pritaikant hiperbolės funkciją gautoms anizotropijos reikšmėms (žr. duomenų analizė).

### **ATP hidrolizės eksperimentai**

ATPazinio aktyvumo reakcijos buvo atliekamos esant 37°C temperatūrai 1 val. reakcijos buferyje 1 ir papildomai pridėjus 50  $\mu$ M ATP (3,3 nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP) ir 0,01  $\mu$ g/ $\mu$ l įvairių DNR: (i)  $\lambda$  fago DNR (dam<sup>+</sup>dcm<sup>+</sup>), (ii) pBR322, (iii) pBR322 metilintos CgII atpažinimo sekose, (iv) specifinio H1 fragmento, (v) nespecifinio N1 fragmento, (vi) specifinio SP16 oligoduplekso, (vii) nespecifinio NSP16 oligoduplekso ir (viii) viengrandinės M13mp18. Reakcijos pradėtos pridėjus 40 nM CgII baltymų, o stabdytos pridėjus EDTA iki 30 mM galutinės konc. 1  $\mu$ l sustabdytos reakcijos užnešta ant plonasluoksnės polietilenimino-celiuliozės plokštelės (Merck), kur ATP (substratas) ir ADP (produktas) analizuoti chromatografijos būdu TLC buferyje. Gauti vaizdai analizuoti panaudojant Fujifilm FLA-5100 fluorescencinių vaizdų analizatoriumi (Fujifilm, Tokyo, Japan).

„Malachite green phosphate assay kit“ rinkinys naudojamas ATP hidrolizės greičiui paskaičiuoti, nustatant susidariusio laisvo fosfato kiekį tirpale. Reakcijos atliktos esant 37°C temperatūrai tuose pačiuose buferiuose, kaip ir buvo naudojami eksperimentuose su radioaktyvia žyme žymėta ATP. Į reakcijas papildomai buvo pridėta 0,02  $\mu$ g/ $\mu$ l  $\lambda$  fago DNR (dam<sup>+</sup>dcm<sup>+</sup>), ATP (1, 2, 4 arba 6 mM) ir 1 mM (d)NTP. Reakcijos pradėtos pridėjus 10 nM H.CgII arba jo domenų ir 200 nM R.CgII. Tam tikrais laiko intervalais iš reakcijų paimti mėginiai sumaišyti su EDTA iki 9,5 mM galutinės konc. Sąsaja tarp absorbcijos ir susidariusio fosfato koncentracijos buvo paskaičiuota panaudojant standartinį fosfato tirpalą. Fosfato susidarymo greitis ( $v$ ,  $\mu$ M  $\cdot$  min<sup>-1</sup>) ir ATP hidrolizės greitis (ATP/s/monomerui) paskaičiuotas iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų.

### **DNR hidrolizės eksperimentai**

R.CgII nukleazinio aktyvumo tyrimas. DNR hidrolizės eksperimentai atlikti esant 37°C temperatūrai 1 val. reakcijos buferyje: 33 mM Tris-acetato (pH 7,0 esant 25°C),

0,1 mg/ml JSA, 150 mM K-acetato, 10 mM Mg-acetato, 1 mM DTT, 4 mM AMP-PNP arba ADP, 4 mM (d)NTP, 25 mM fosfokreatino, 5 U/ml kreatino kinazės ir papildomai pridėjus 0,01 µg/µl λ fago DNR (dam<sup>+</sup>dcm<sup>+</sup>). Reakcijos pradėtos pridėjus 200 nM H.CgII ir 200 nM R.CgII. Reakcijos stabdytos sumaišius santykiu 2:1 (v/v) su DNR užnešimo tirpalu 1 ir inkubuota 15 min. 70°C. Susidarę produktai frakcionuoti 0,8 arba 1,0% (w/v) agarozės geliuose nedematūruojančios elektroforezės būdu, o gauti fragmentai nudažyti etidžio bromidu ir fotografuoti panaudojant ultravioletinę šviesą.

DNR hidrolizės kinetiniai tyrimai. DNR (10 nM) hidrolizės reakcijos atliktos esant 37°C temperatūrai reakcijos buferyje 3. Reakcijos pradėtos pridėjus 1000 nM H.CgII ir 1000 nM R.CgII. Tam tikrais laiko intervalais iš reakcijų paimti mėginiai sumaišyti su 1:1 (v/v) DNR užnešimo tirpalu 2 ir inkubuoti 70°C 15 min. Susidarę produktai frakcionuoti 0,8 arba 1,0% (w/v) agarozės geliuose nedematūruojančios elektroforezės būdu, esant 0,5 µg/ml etidžio bromido, o santykiniai DNR kiekiai paskaičiuoti gelio densitometrijos būdu kaip aprašyta aukščiau. Likusi DNR substrato dalis kiekviename mėginyje paskaičiuota pagal formulę:  $\text{kiekis}_{(\text{likusio DNR substrato})} / (\text{kiekis}_{(\text{likusio DNR substrato})} + \text{kiekis}_{(\text{susidariusio DNR produkto})})$ . DNR hidrolizės greičiai gauti pritaikius funkciją DNR substrato nykimo vidurkinėms reikšmėms, paskaičiuotoms iš mažiausiai trijų nepriklausomų DNR hidrolizės eksperimentų (žr. duomenų analizę).

H.CgII mutantų DNR hidrolizės aktyvumas tikrintas naudojant 10 nM vieną CgII taikinį turinčią p1 plazmidinę DNR. Reakcijos inkubuotos reakcijos buferyje 2 esant 37°C temperatūrai. Reakcijos pradėtos pridėjus 200 nM H.CgII arba jo mutanto ir 200 nM R.CgII. Tam tikrais laiko intervalais iš reakcijų paimti mėginiai sumaišyti su 1:1 (v/v) DNR užnešimo tirpalu 2 ir inkubuoti 70°C 15 min. Susidarę produktai frakcionuoti ir analizuoti kaip aprašyta aukščiau.

H.CgII domenų DNR hidrolizės aktyvumas tikrintas naudojant 10 nM pBR322 plazmidinę DNR. Reakcijos inkubuotos 1 val. reakcijos buferyje 2 esant 37°C temperatūrai. Reakcijos pradėtos pridėjus 200 nM H.CgII arba jo domeno/ų ir 200 nM R.CgII. Reakcijos sustabdytos ir gauti produktai analizuoti kaip aprašyta aukščiau. DNR hidrolizės greičiai paskaičiuoti kaip aprašyta aukščiau.

DNR kirpimo vietos nustatymas. CgII restrikcijos endonukleazės kirpimo vietos nustatymui buvo naudojama vieną CgII taikinį turinti p1 plazmidinė DNR (10 nM) ir ją karpant 1 val. 37°C reakcijos buferyje 2. Reakcijos pradėtos pridėjus 500 nM H.CgII ir 500 nM R.CgII. Reakcijos sustabdytos pridėjus 2:1 (v/v) santykiu su DNR užnešimo tirpalu 2 ir inkubuota 75°C 15 min. Susidarę produktai frakcionuoti 1,0% (w/v) agarozės gelyje nedematūruojančios elektroforezės būdu ir išgryninti panaudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ rinkinį. Produktai sekvenuoti su MZ-437 ir MZ-438 oligonukleotidiniais pradmenimis (2 lentelė).

### **Struktūrinis modeliavimas**

H.CgII DEAD-Z1 domenų struktūrinis modelis gautas kaip aprašyta žemiau. Eilė homologinių modelių buvo gauta iš aukšto įverčio HHpred palyginimų panaudojant MODELLER (Sali ir kt., 1993) ir įvairias helikazes kaip struktūrinius šablonus. Modelio kokybė buvo testuota VoromQA programa (Olechnovic ir kt., 2017). Reprezentatyvus modelis gautas remiantis trimis struktūriniais šablonais: (1) PriA helikaze (Bhattacharyya ir kt., 2014a) (PDB ID 4NL4); (2) I tipo EcoR124I HsdR subvieneto kompleksu su ATP (PDB ID 4XJX); ir (3) „DEAD-box“ baltymu Dhh1p (Cheng ir kt., 2005) (PDB ID 1S2M). Ilgos kilpos ir regionai, kurie nebuvo uždengti struktūrinių šablonų, buvo sumodeliuoti panaudojant I-Tasser (Roy ir kt., 2010). Modelis buvo



patobulintas pasitelkiant molekulinę dinamiką (Zhang ir kt., 2011). ATP buvo įmodeliuotas į gautą DEAD-Z1 modelį tiesiog nukopijavus ją iš EcoR124I HsdR struktūros. Apytikslė surištos DNR pozicija buvo gauta lyginant H.CgII modelį su SsoRad54-DNR kompleksu (Durr ir kt., 2005) (PDB ID 1Z63) (21B pav.).

### **Kristalizacija ir erdvinės struktūros nustatymas**

Nežymėtas ir žymėtas su Se-Met C-galiniai domenai buvo sukonzentruoti iki 15 mg/ml buferyje (10 mM Tris-HCl (pH 7,5 esant 25°C), 300 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). Kristalai užauginti sėdinčio lašo garų difuzijos metodu esant 19°C temperatūrai sumaišius 0,5 μl baltymų mišinį su 0,5 μl kristalizacijos buferiu (0,1 M Tris-HCl (pH 8,5 esant 25°C), 7-14% (v/v) Taksimatas, 25-30% (w/v) PEG3350). Se-Met žymėto baltymo Rentgeno spindulių difrakcijos duomenys gauti panaudojant EMBL/DESY PetraIII P14 spindulių šaltinį (Vokietija) esant 100 K ir rezervuaro tirpalą su 20% (v/v) etilenglikoliu kaip kryo-buferį. Duomenų analizei panaudotos XDS (Kabsch, 2010), SCALA ir TRUNCATE (CCP4, 1994) programos. Laukinio tipo C-galinio domeno kristalai difragavo spindulius 2,9 Å skiriamąja geba, o Se-Met žymėtas C-galinis domeno kristalai – 2,4 Å.

Struktūra išspręsta panaudojant Auto-Rickshaw 3W-MAD protokolą (Panjikar ir kt., 2005). Prieš tai difrakcijos duomenys buvo apdoroti ir konvertuoti panaudojant CCP4 rinkinio programos (CCP4, 1994). FA reikšmės paskaičiuotos panaudojant SHELXC programą (Sheldrick ir kt., 2001). Remiantis pradine duomenų analize, didžiausia skiriamoji geba 2,40 Å buvo parinkta substruktūros nustatymui ir pradinių fazių skaičiavimui. Du sunkieji metalai iš dviejų galimų buvo surasti panaudojant SHELXD programą (Schneider ir kt., 2002). Teisinga substruktūra nustatyta panaudojant ABS (Hao, 2004) ir SHELXE (Schneider ir kt., 2002) programos. Pradinės fazės paskaičiuotos panaudojant SHELXE programą (Schneider ir kt., 2002). 77,53% modelio gauta panaudojant ARP/wARP programą (Morris ir kt., 2004). Rankinis modelio taisymas atliktas panaudojant COOT (Emsley ir kt., 2004). Gauta struktūra patobulinta su phenix.refine.1.8.3 (Afonine ir kt., 2012). TLS grupės nustatytos TLSMD serverio pagalba (<http://skuld.bmsc.washington.edu/~tmsmd/>) (Painter ir kt., 2006). Kristalo kontaktai analizuoti panaudojant PISA serverį (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/protint/pistart.html>) (Krissinel ir kt., 2007). Elektrostatinis paviršiaus potencialas paskaičiuotas su PDB2PQR ir APBS (Baker ir kt., 2001; Dolinsky ir kt., 2004). Reprezentatyvūs struktūrų vaizdai gauti panaudojant PyMOL (Versija 1.2r3pre, Schrödinger, LLC) (Schrödinger).

### **Duomenų analizė**

Triplekso nustūmimo ir DNR hidrolizės greičių skaitinės reikšmės gautos pritaikius pirmo arba antro laipsnio eksponentines funkcijas gautoms eksperimentinių duomenų reikšmėms panaudojant KyPlot (versija 2,0 (Yoshioka, 2002)). Triplekso nustūmimo greičių konstantos ( $k_1$  ir  $k_2$ ) paskaičiuotos panaudojant šias funkcijas:

$$S = 100 \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (1)$$

$$S = [A_1] + [100 - A_1] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (2)$$

$$S = [A_1] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + [100 - A_1] \cdot \exp(-k_2 \cdot t) \quad (3)$$

Kur S yra likusio substrato dalis procentais,  $A_1$  ir  $100 - A_1$  yra atitinkamai pirmos ir antros fazės amplitudės,  $k_1$  ir  $k_2$  yra atitinkamai pirmos ir antros fazės greičių konstantos,  $t$  yra reakcijos laikas sekundėmis.

DNR hidrolizės greičių konstantos ( $k_1$ ) paskaičiuotos panaudojant šias funkcijas:

$$S = [A_1] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) \quad (4)$$

$$S = [A_1] \cdot \exp(-k_1 \cdot t) + [A_2] \quad (5)$$

$$P = [A_1] \cdot (1 - \exp(-k_1 \cdot t)) \quad (6)$$

Kur  $S$  yra likusio substrato koncentracija (nM),  $P$  yra susidariusio produkto koncentracija (nM),  $A_1$  yra pirmos fazės amplitudė,  $A_2$  yra laisva amplitudė,  $k_1$  yra pirmos fazės greičio konstanta,  $t$  yra reakcijos laikas sekundėmis. Visais atvejais kinetiniai profiliai yra gana sudėtingi, kadangi hidrolizė susideda iš daug žingsnių. Todėl eksponentinės funkcijos yra labiau naudojamos tik gautų greičio konstantų palyginimui, nei tam tikrų įvykusių žingsnių greičių konstantų matavimui.

Nespecifinio oligonukleotido susirišimo su CgII baltymais  $K_d$  reikšmės paskaičiuotos panaudojant kvadratinę funkciją:

$$C = (d + p + K_d - [(d + p + K_d)^2 - 4 \cdot d \cdot p]^{0.5}) / 2 \quad (7)$$

Kur  $C$  yra suformuoto baltymo-DNR komplekso koncentracija (nM) esant kiekvienai baltymo koncentracijai  $p$  (nM),  $d$  yra DNR koncentracija naudota susirišimo mėginyje (nM),  $K_d$  yra baltymo-DNR komplekso disociacijos konstanta (nM).

Mant-ATP susirišimo su CgII baltymais  $K_d$  reikšmės paskaičiuotos panaudojant hiperbolę:

$$A = [A_0] + [A_1] \cdot p / (K_d + p) \quad (8)$$

Kur  $A$  yra stebimos anizotropijos skaitinės reikšmės esant kiekvienai baltymo koncentracijai  $p$  ( $\mu\text{M}$ ),  $A_0$  yra anizotropijos skaitinė reikšmė esant laisvam Mant-ATP,  $A_1$  yra laisva amplitudė,  $K_d$  yra baltymo-Mant-ATP komplekso disociacijos konstanta ( $\mu\text{M}$ ).

### 3 lentelė. CgII baltymų ir jų domenų klonavimas, raiška ir gryninimas.

Baltymas/ domenas/ kompleksas	Ilgis (be inkaro), ar.	Gryninimui skirtas inkaras <sup>a</sup> , galas	Molekulinė masė, Da <sup>b</sup>	Ekstinkcijos koeficientas, M <sup>-1</sup> cm <sup>-1b</sup>	Raiškos vektorius <sup>c</sup> , atsparumas antibiotikui	<i>E. coli</i> kamienas <sup>d</sup> , atsparumas antibiotikui	Raiškos temperatūra, trukmė, induktorius <sup>e</sup>	Gryninimo kolonėlės <sup>f</sup>	Saugojimo buferis <sup>g</sup>
R.CgII	358	StrepII, N	41242,5	45380	pBAD24, Ap <sup>r</sup>	ER2267, Kn	16°C, per naktį, 0,2% (w/v) L(+)-arabinozė	StrepTrap HP, MonoQ	2
H.CgII	632	His <sub>6</sub> , C	71933,9	66810	pBAD24, Ap <sup>r</sup>	ER2267, Kn	16°C, per naktį, 0,2% (w/v) L(+)-arabinozė	HisTrap HP, HiPrep desalting	2
R.CgII + H.CgII	358 + 632	StrepII, N His <sub>6</sub> , C	41242,5 71933,9	45380 66810	pETDuet-1, Ap <sup>r</sup>	ER2566, -	16°C, per naktį, 1 mM IPTG	HisTrap HP, StrepTrap HP, Superdex <sup>TM</sup> 200 10/300 GL	2
R.CgII-PLD <sup>h</sup>	178, 1-178	StrepII, N	21771,8	15930	pETDuet, Ap <sup>r</sup>	BL-21 (DE3), -	16°C, per naktį, 1 mM IPTG	HisTrap HP, HiPrep desalting	2
R.CgII-B3	180, 179-358	His <sub>6</sub> , C	20918,1	29450	pLATE31, Ap <sup>r</sup>	ER2566, -	16°C, per naktį, 1 mM IPTG	HisTrap HP	1
H.CgII-DEAD	229, 1-229	His <sub>6</sub> , N	28369,4	21430	pLATE51, Ap <sup>r</sup>	BL-21 (DE3), -	37°C, 4h, 1 mM IPTG	HisTrap HP, HiTrap Q FF	2
H.CgII-DEAD-Z1	463, 1-463	His <sub>6</sub> , N	55339,8	45840	pLATE51, Ap <sup>r</sup>	BL-21 (DE3), -	37°C, 4h, 1 mM IPTG	HisTrap HP, Superdex 200 GL	2
H.CgII-Z1	234, 230-463	His <sub>6</sub> , C	28056,5	24410	pLATE31, Ap <sup>r</sup>	BL-21 (DE3), -	16°C, per naktį, 1 mM IPTG	HisTrap HP, HiPrep desalting	2
H.CgII-Z1-C	403, 230-632	His <sub>6</sub> , C	46723,8	45380	pLATE31, Ap <sup>r</sup>	BL-21 (DE3), -	16°C, per naktį, 1 mM IPTG	HisTrap HP, Superdex 200 GL	2
H.CgII-C	169, 464-632	His <sub>6</sub> , C	19753,5	20970	pLATE31, Ap <sup>r</sup>	BL-21 (DE3), -	16°C, per naktį, 1 mM IPTG	HisTrap HP, HiPrep desalting	2

<sup>a</sup>Gryninimui skirti priliesti inkarai nebuvo pašalinti prieš eksperimentus.

<sup>b</sup>Molekulinės masės ir ekstinkcijos koeficientai paskaičiuoti su ProtParam įrankiu, <http://web.expasy.org/protparam>.

<sup>c</sup>pBAD24 gautas iš Invitrogen, pETDuet-1 – iš Novagen, pLATE31 ir pLATE51 – iš Thermo Fisher Scientific (Vilnius).

<sup>d</sup>*E. coli* kamienas turėjo pACYC184 plazmidinę DNR (Cm atsparumas) su į ją įterptu CgII metiltransferazės genu.

<sup>e</sup>Prieš raišką ląstelės auginamos LB terpėje su atitinkamais antibiotikais (Ap (100 µg/ml), Kn (25 µg/ml), Cm (30 µg/ml)) esant 37°C iki OD<sub>600</sub> ~0,5-0,6.

<sup>f</sup>Visos kolonėlės įsigytos iš GE Healthcare. Kolonelių naudojimo eiliškumas atitinka jų išvardinimo eiliškumą. Naudoti buferiai: Buferis 1 HisTrap HP kolonėlei; Buferis 2 HiPrep desalting, MonoQ, HiTrap ir HiTrap Q FF kolonėlėms; Buferis 3 HiPrep desalting ir MonoQ kolonėlėms; Buferis 4 HiTrap Q FF ir MonoQ kolonėlėms; Buferis 5 StrepTrap HP kolonėlei; Buferis 6 HisTrap HP ir Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL kolonėlei; Buferis 7 HisTrap HP kolonėlei; Buferis 8 StrepTrap HP kolonėlei; Buffer 9 HisTrap HP kolonėlei. Visi gryninimo darbai atlikti pagal gamintojo rekomendacijas.

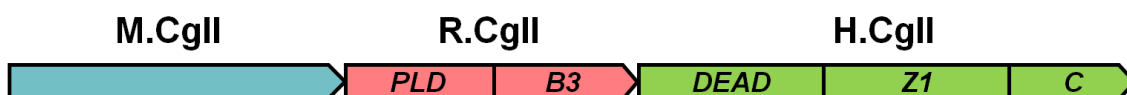
<sup>g</sup>Saugojimo buferis 1: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 200 mM KCl, 2 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% (v/v) glicerolio; Saugojimo buferis 2: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0 esant 25°C), 400 mM KCl, 2 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 50% (v/v) glicerolio.

<sup>h</sup>R.CgII-PLD domenas turi aktyvaus centro mutaciją H105A.

# REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

## 1. CgII restrikcijos-modifikacijos sistema iš *C. glutamicum* kamieno

Mūsų tyrimo objektas yra netipinė restrikcijos-modifikacijos (RM) sistema CgII iš *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032). RM sistemų duomenų bazėje REBASE (<http://rebase.neb.com>) (Roberts ir kt., 2015) CgII sistema priskiriama II tipo RM sistemoms. II tipo RM sistemas paprastai sudaro du fermentai: restrikcijos endonukleazė ir DNR metiltransferazė. Metiltransferazė naudodama SAM kaip metilo grupės donora modifikuoja specifines sekas dvigrandinėje DNR (Pingoud ir kt., 2014). Restrikcijos endonukleazė atpažįsta trumpas, paprastai 4-8 bp ilgio, DNR sekas ir perkerpa dvigrandinę DNR atpažinimo sekoje ar greta jos (Pingoud ir kt., 2001). Tačiau, CgII sistemą sudaro trys fermentai: metiltransferazė (M.CgII), spėjama fosfolipazių D superšeimos restrikcijos endonukleazė (R.CgII) ir spėjama SF2 superšeimos helikazė/ATPazė (H.CgII) (1 pav.).



**1 pav. *Corynebacterium glutamicum* (CgII) restrikcijos-modifikacijos sistemos sudėtis.** M.CgII (ORF NCgl1703) yra 5-metilcitozino DNR metiltransferazė. R.CgII (NCgl1704) yra spėjama restrikcijos endonukleazė, turinti fosfolipazių D superšeimos nukleazinį domeną ir domeną panašų į B3 DNR surišimo domeną. H.CgII (NCgl1705) yra spėjama SF2 helikazė/ATPazė, turinti DEAD, necharakterizuotą Z1 superšeimai priklausantį ir C-galinį domeną.

M.CgII subvienetas yra II tipo 5-metilcitozino DNR metiltransferazė, atpažįstanti 5'-GCSGC-3' DNR seką (kur S yra G arba C) (Schafer ir kt., 1997). Buvo parodyta, kad ji kaip ir II tipo metiltransferazės, yra aktyvi kaip atskiras baltymas (Landry ir kt., 1992).

Bioinformatikiniai metodais nustatyta, kad spėjamos restrikcijos endonukleazės subvienetas (R.CgII) turi du domenų: N-galinį domeną, kuriame yra fosfolipazių D (PLD) superšeimos HxK aktyvaus centro sekos motyvas ir į B3 domenų panašų C-galinį domeną, atsakingą už DNR surišimą (Zaremba ir kt., 2014) (1 pav.). PLD superšeimai priklausantis N-galinis domenas taip pat yra būdingas plačiai studijuotai ir nuo metalo jonų nepriklausomai IIS tipo restrikcijos endonukleazei BfiI, kuri atpažįsta asimetrinę 5'-ACTGGG-3' seką. Spėjama, kad R.CgII hidrolizuoja DNR tik reakcijos mišinyje esant H.CgII subvienetui. Panašus R ir H subvienetų tarpusavio ryšys buvo pastebėtas *in vitro* DNR hidrolizės eksperimentuose su homologine RM sistema BceSIV iš *Bacillus cereus* (Xu ir kt., 2012).

Kompiuterinė aminorūgščių sekų analizė parodė, kad H.CgII yra sudaryta iš trijų domenų: N-galinio DEAD domeno, būdingo SF2 superšeimos helikazėms, Z1 domeno, būdingo Z1 superšeimai, ir C-galinio domeno (Zaremba ir kt., 2014) (1 pav.). DEAD domenai yra randami SF2 helikazėse, kurios dalyvauja nuo ATP priklausomose nukleorūgščių išvyniojimo ir translokacijos procesuose (Singleton ir kt., 2007). Iki šiol necharakterizuotas Z1 domenai yra dažnai sutinkami kartu su SF2 helikaziniu domenu (Iyer ir kt., 2008). Be to, SF2 helikazėms būdingi motyvai yra randami ir I, ISP, III tipo

fermentuose (Chand ir kt., 2015; Gorbalyena ir kt., 1991; McClelland ir kt., 2004). Tokiu būdu CgII restrikcijos endonukleazei gali būti būdingas naujas, iki šiol neištirtas DNR hidrolizės mechanizmas.

## 2. Spėjamų restrikcijos endonukleazės ir ATPazės subvienetų iš CgII RM sistemos charakterizavimas

### 2.1. R.CgII ir H.CgII baltymų ir jų domenų raiška ir gryninimas

Norėdami charakterizuoti baltymus iš CgII RM sistemos, pirmiausiai išreiškėme R.CgII ir H.CgII ir jų mutantus bei atskirus arba sulietus domenus ir jų mutantus su gryninimui skirtais His<sub>6</sub> arba StrepII inkarais (3 lentelė). Taip pat buvo atlikta iš karto abiejų R.CgII ir H.CgII baltymų raiška (3 lentelė). Visi baltymai buvo išreikšti *E. coli* ląstelėse ir išgryninti (>90% grynumas) pasitelkiant skysčių chromatografiją. Visų išgrynintų baltymų aminorūgščių sekos patvirtintos masių spektrometrijos būdu.

### 2.2. CgII baltymų ir jų domenų oligomerinės būsenos nustatymas

Kitame etape gelfiltracijos būdu buvo nustatoma pavienių R ir H baltymų ir jų domenų iš CgII RM sistemos oligomerinė būsena tirpale (4 lentelė). R.CgII ir R.CgII-PLD domenas eliuavo kaip dimerai, o R.CgII-B3 domenas eliuavo kaip monomeras (4 lentelė). H.CgII ir jo DEAD-Z1, Z1 ir Z1-C domenai eliuavo kaip dimerai, o H.CgII baltymo DEAD ir C-galinis domenas eliuavo kaip monomeras (4 lentelė).

**4 lentelė. CgII baltymų ir jų domenų oligomerinės būsenos tirpale analizė.**

Baltymas/domenas	M <sub>m</sub> , kDa		Oligomerinė būsena	
	Teorinė masė <sup>a</sup>	Gelfiltracija, M <sub>m(eksp)</sub> / M <sub>w(teor)</sub>		SAXS, M <sub>m(eksp)</sub> / M <sub>m(teor)</sub>
R.CgII <sup>b</sup>	41,2	85,0 <b>2,1</b>	84,7 <b>2,1</b>	Dimeras
R.CgII-PLD	21,8	30,4 <b>1,5</b>		Dimeras
R.CgII-B3	23,1	26,3 <b>1,1</b>		Monomeras
H.CgII <sup>b</sup>	71,9	128,8 <b>1,8</b>	136,1 <b>1,9</b>	Dimeras
H.CgII-DEAD	28,4	29,5 <b>1,0</b>		Monomeras
H.CgII-DEAD-Z1	55,3	102,8 <b>1,9</b>		Dimeras
H.CgII-Z1	28,1	42,4 <b>1,5</b>		Dimeras
H.CgII-Z1-C	46,7	91,2 <b>2,0</b>		Dimeras
H.CgII-C	19,8	17,9 <b>0,9</b>		Monomeras
R.CgII + H.CgII <sup>b</sup>	113,2 <sup>c</sup>	243,6 <b>2,2</b>	231,8 <b>2,0</b>	Heterotetrameras (R <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )

<sup>a</sup>Teorinė molekulinė masė paskaičiuota su ProtParam įrankiu, <http://web.expasy.org/protparam>.

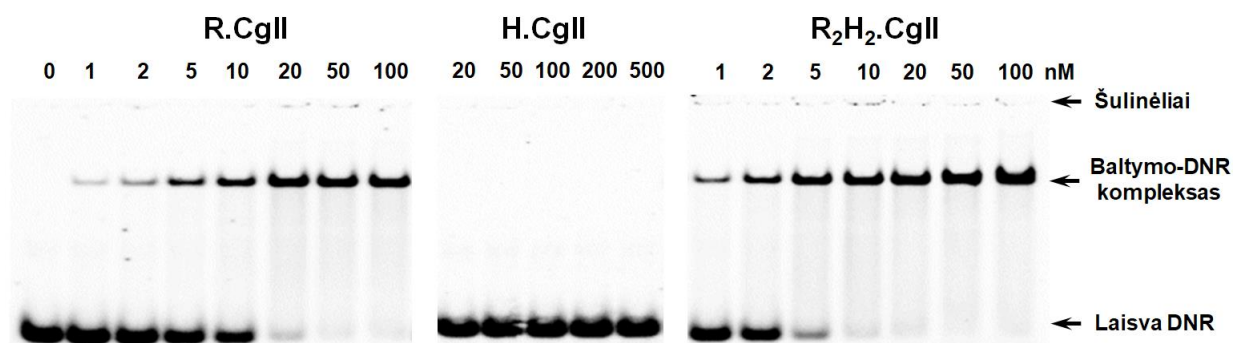
<sup>b</sup>Pilno ilgio baltymai ir jų kompleksai parodyti pilkame fone.

<sup>c</sup>Ši reikšmė gauta susumavus atskirų R.CgII ir H.CgII baltymų monomerų teorines molekulinės mases.

SAXS eksperimentiniai duomenys taip pat patvirtino R ir H baltymų oligomerines būsenas, gautas gelfiltracijos būdu (Zaremba ir kt., 2014) (4 lentelė). CgII komplekso molekulinė masė, gauta gelfiltracijos ir SAXS eksperimentų būdu, artima gautų dimerinių R ir H baltymų molekulinė masė sumai (4 lentelė). Iš to seka išvada, kad R.CgII ir H.CgII sudaro heterotetramerinį  $R_2H_2$ .CgII kompleksą. Heterotetramerinė restrikcijos endonukleazės CgII komplekso ( $R_2H_2$ ) būsena yra dalinai panaši į I ir III RM tipo fermentų sudaromų kompleksų būsenas, tačiau atitinkamai juose aktyvūs  $R_2M_2S_1$  ir  $Res_2Mod_1$  kompleksai yra sudaryti iš restrikcijos endonukleazės (R arba Res), metiltransferazės (M arba Mod) ir specifiškumo (S) subvienetų.

### 2.3. CgII baltymų susirišimas su DNR

CgII baltymų susirišimas su DNR tirtas EMSA būdu panaudojant  $^{33}P$  žymėtą 33 bp specifinį oligodupleksą (2 pav.). R.CgII formavo specifinius kompleksus su specifine DNR, tuo tarpu H.CgII nerišo DNR (2 pav.). Be to, pavienis R.CgII baltymo B3 domenas formavo specifinį kompleksą tik su specifine DNR (Zaremba ir kt., 2014).  $R_2H_2$ .CgII kompleksas rišo specifinį oligodupleksą ir sudarė baltymo-DNR kompleksą, kuris migravo kaip ir suformuotas baltymo-DNR kompleksas su R.CgII baltymu (2 pav.). Tai gali būti paaiškinama tuo, kad  $R_2H_2$ .CgII kompleksas disocijuoja EMSA tyrimo metu. Nespecifinio oligoduplekso atveju (33 bp) buvo stebimas nežymus arba išvis nestebimas R ir H baltymų bei  $R_2H_2$  komplekso susirišimas su DNR (Zaremba ir kt., 2014). Remiantis gautais rezultatais, mes spėjame, kad R baltymo B3 domenas yra atsakingas už specifinę sąveiką su DNR.



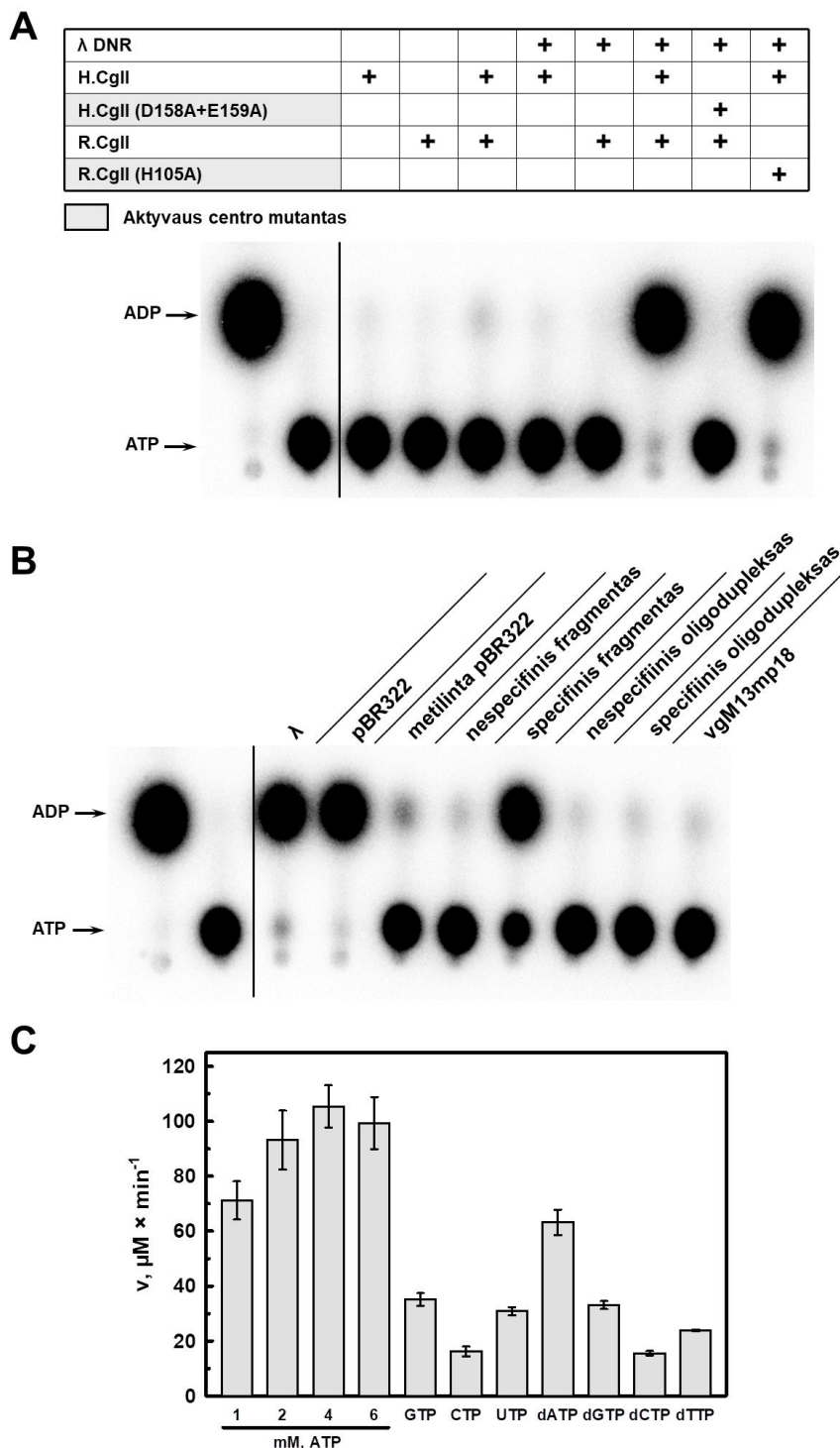
**2 pav. DNR susirišimas su CgII baltymais.** (A) CgII baltymų susirišimas su specifine DNR.  $K_d$  konstantų skaitinės vertės yra  $9,2 \pm 2,8$  nM R.CgII baltymui ir  $1,9 \pm 0,6$  nM  $R_2H_2$ .CgII baltymui. Visose reakcijose buvo 1 nM  $^{33}P$  žymėto specifinio oligoduplekso, o naudota baltymų konc. nurodyta virš kiekvieno takelio.

### 2.4. ATP hidrolizės tyrimai

H.CgII baltymo N galiniame domene yra SF2 helikazės/ATPazės būdingi motyvai, kurie sutinkami „DEAD-box“ šeimai priklausančiuose baltymuose (Byrd ir kt., 2012; Zaremba ir kt., 2014). Helikazės naudoja ATP hidrolizės energiją nukleorūgščių išvyniojimui ir/arba translokacijai, ir/arba nukleorūgščių ar baltymų-nukleorūgščių kompleksų permodeliavimui (Cordin ir kt., 2006; Fairman-Williams ir kt., 2010; Singleton ir kt., 2007). Taip pat SF2 helikazių motyvai aptinkami I, ISP ir III RM tipo fermentuose, kurie naudoja ATP hidrolizę DNR kirpimui (Chand ir kt., 2015; Szczelkun, 2013). SF2 helikazės/ATPazės būdingi motyvai esantys H.CgII subvienete rodo, kad



H.CglI galėtų būti nuo DNR priklausoma ATPazė. Kad patikrintume šią hipotezę, iš pradžių buvo ištirtas H.CglI ATPazinis aktyvumas plonasluoksnės chromatografijos būdu panaudojant radioaktyvia žymę žymėtą substratą [ $\alpha^{32}$ P]ATP (3A pav.).



**3 pav. H.CglI baltymo ATPazinis aktyvumas.** (A) ATPazinio aktyvumo tyrimas panaudojant plonasluoksnę chromatografiją. Reakcijose pridėta: 50  $\mu\text{M}$  [ $\alpha^{32}$ P]ATP, 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\lambda$  fago DNR, 40 nM H.CglI arba R.CglI. (B) H.CglI baltymo ATPazinis aktyvumas esant įvairiai DNR. Reakcijos atliktos taip pat kaip ir A paveiksle, papildomai pridėjus 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  įvairių DNR (žr. detales tekste). (C) (d)NTP hidrolizės greičiai. Reakcijose pridėta: 0,02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\lambda$  fago DNR, 10 nM H.CglI, 200 nM R.CglI, 1-6 mM ATP arba 1 mM (d)NTP.

ATP hidrolizė nebuvo stebima, kai reakcijos mišinyje buvo tik H.CgII, nepriklausomai su ar be dvigrandinės  $\lambda$  fago DNR. Tačiau H.CgII ATPazinis aktyvumas ženkliai išaugo pridėjus R.CgII ir DNR (3A pav.). D158A ir E159A mutacijos H.CgII baltymo aktyvaus centro DEAD motyve (Hmut) panaikino ATPazinį aktyvumą. Priešingai, H105A mutacija R.CgII baltymo aktyvaus centro HxK motyve (Rmut) neturėjo įtakos H.CgII baltymo ATP hidrolizės efektyvumui. Šie rezultatai patvirtina, kad H.CgII yra ATPazė, kuri yra priklausoma nuo DNR ir kataliziškai (ne-) aktyvaus endonukleazės subvieneto (R.CgII).

Toliau buvo tiriamas  $R_2H_2$ .CgII komplekso ATPazinis aktyvumas reakcijos mišinyje esant įvairiems dvigrandiniams linijiniams ir plazmidiniams DNR substratams, kurie turi 0, 1 ar daugiau CgII atpažinimo sekų (nemodifikuotos arba modifikuotos su M.CgII) arba žiedinei viengrandinei M13mp18 (3B pav.).  $R_2H_2$ .CgII komplekso ATPazinis aktyvumas buvo stebimas reakcijos mišinyje esant  $\lambda$  fago DNR, žiedinei plazmidinei pBR322 DNR arba linijiniam DNR fragmentui, turinčiam atpažinimo taikinį (3B pav.). Tačiau 16 bp specifinis oligodupleksas su CgII atpažinimo seka nestimuliuoja ATPazinio aktyvumo. Nežymi arba išvis nestebima ATP hidrolizė, kuomet į reakcijas buvo pridėta CgII atpažinimo sekose metilintos pBR322, nespecifinio DNR fragmento ar oligoduplekso, viengrandinės DNR (3B pav.). Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad H.CgII baltymo ATPazinis aktyvumas priklauso nuo ilgo CgII atpažinimo sekose (5'-GCSGC-3') nemetilinto dvigrandinio DNR fragmento ir kuomet H.CgII sudaro kompleksą su R.CgII subvienetu.

Kitame darbo etape buvo nustatyta  $R_2H_2$ .CgII komplekso ATPazinio aktyvumo priklausomybė nuo ATP koncentracijos ir ištirta, ar kompleksas sugeba hidrolizuoti ir kitus (deoksi) nukleozido trifosfatus (3C pav.). Gauti rezultatai parodė, kad maksimalus fosfato susidarymo greitis pasiekiamas reakcijos mišinyje esant ~4 mM ATP.  $R_2H_2$ .CgII kompleksas efektyviausiai hidrolizuoja ATP ir dATP, tačiau pakankamai efektyviai hidrolizuoja ir GTP bei dGTP (~2 kartus lėčiau nei ATP). Kiti (d)NTP taip pat gali būti hidrolizuojami, tik ~5 kartus lėčiau nei ATP (3C pav.). Esant optimaliai DNR ir R.CgII baltymo koncentracijai, bei 4 mM ATP koncentracijai, viena H.CgII molekulė hidrolizuoja  $\sim 176 \pm 13$  ATP/s greičiu.

Gauti ATP hidrolizės eksperimentiniai duomenys rodo, kad R ir H baltymai iš CgII sistemos veikia kartu sudarydami baltymo-DNR kompleksą. CgII komplekso didžiausias ATP hidrolizės greitis yra apie ~175 ATP/s/monomerui (esant 37°C). Panašus ATP hidrolizės greitis yra stebimas I ir ISP tipo fermentuose (pvz. EcoR124I ATP hidrolizės greitis – ~998 ATP/s/motorui esant 30°C, o LlaBIII – ~460 ATP/s/motorui esant 25°C) kurie naudoja ATP hidrolizę translokacijai ant DNR (Seidel ir kt., 2008; Sisakova ir kt., 2013), tačiau nepanašus į III tipo fermentus, kurie hidrolizuoja tik apie 20-30 ATP molekulių, kad aktyvuotų baltymų difuziją ant DNR (Toth ir kt., 2015).

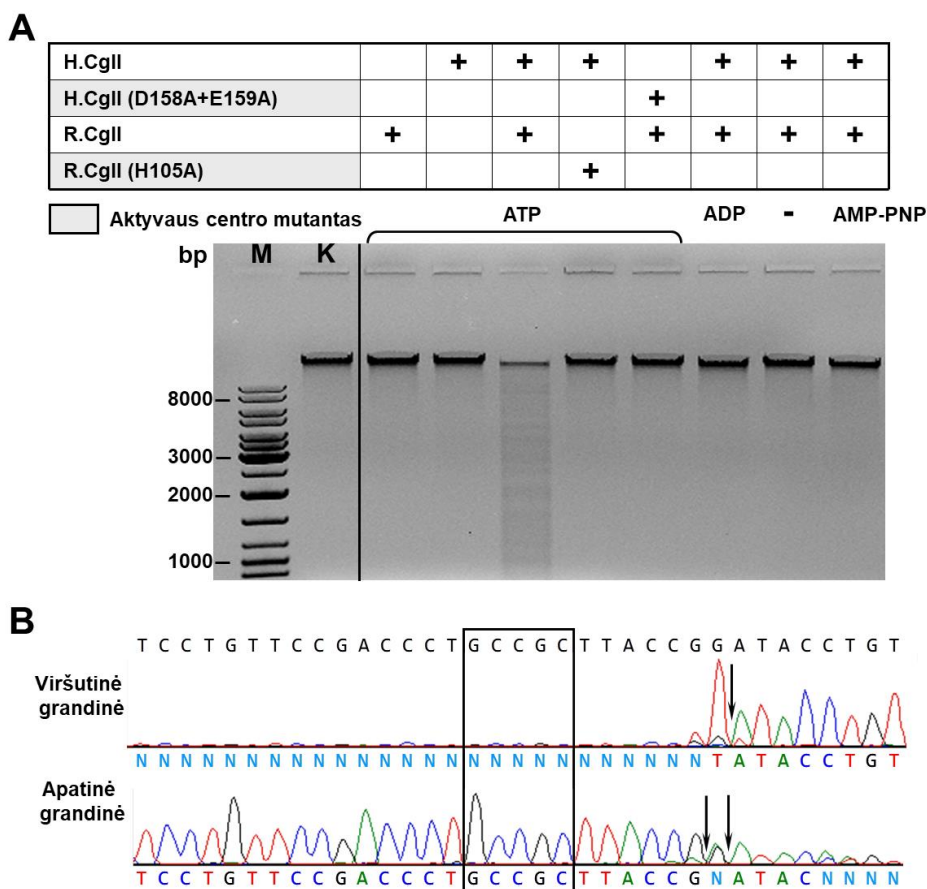
## 2.5. DNR hidrolizės tyrimai

R.CgII turi N-galinį nukleazinį PLD domeną, kuris taip pat sutinkamas ir dimerinėje IIS tipo BfII restrikcijos endonukleazėje (Lagunavicius ir kt., 2003; Sapranauskas ir kt., 2000; Tamulaitiene ir kt., 2014). Mes parodėme, kad R.CgII gali dimerizuotis (3 lentelė), kaip ir BfII (Lagunavicius ir kt., 2003). Nustatyta apo-R.NgoAVII struktūra iš CgII homologinės RM sistemos parodė, kad R.NgoAVII ir BfII yra struktūriškai labai panašūs baltymai (Grazulis ir kt., 2005; Tamulaitiene ir kt., 2014).



Jie abu turi PLD ir B3 domenų, yra dimeriniai baltymai ir turi po vieną aktyvų centrą. Nors R.CgII ir R.NgoAVII baltymai hidrolizuoja dirbtinį substratą bis(*p*-nitrofenil) fosfatą kaip ir BfiI, tačiau pavieniai išgryninti R baltymai, skirtingai negu BfiI, DNR hidrolizė nepasižymėjo (Sapranauškas ir kt., 2000; Zaremba ir kt., 2014).

Norėdami detaliau ištirti R.CgII nukleazinį aktyvumą, mes panaudojome  $\lambda$  fago DNR (turi 181 CgII atpažinimo seką) kaip substratą (4 pav.). Vienas pats R.CgII baltymas DNR nehidrolizavo. Tačiau  $\lambda$  fago DNR hidrolizuojama į reakcijos mišinį papildomai pridėjus H.CgII ir ATP. DNR hidrolizė nebuvo stebima, kuomet bent vienas iš R ir H baltymų buvo aktyvaus centro mutantas. Taip pat DNR hidrolizė nebuvo stebima reakcijos mišinyje nesant ATP ar esant ADP arba AMP-PNP. Tai rodo, kad DNR kirpimui yra būtina ATP hidrolizė (4 pav.).

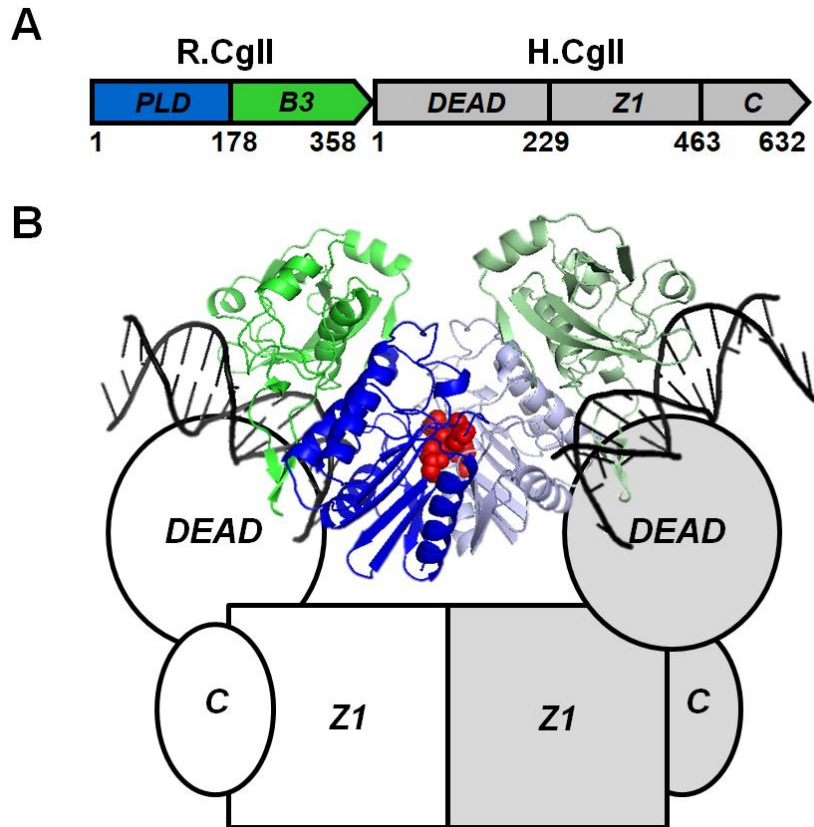


**4 pav. R.CgII baltymo nukleazinis aktyvumas ir kirpimo vietos nustatymas.** (A)  $\lambda$  fago DNR hidrolizė esant R.CgII ir H.CgII baltymų mišiniui. Reakcijose pridėta: 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$   $\lambda$  fago DNR, 200 nM R.CgII arba H.CgII, 4 mM ATP, ADP arba AMP-PNP. (B) R.CgII kirpimo vietos nustatymas sekvenavimo būdu. Atpažinimo seka 5'-GCCGC-3' pažymėta stačiakampiu, o kirpimo vietos pažymėtos rodyklėmis.

Norėdami nustatyti R.CgII baltymo kirpimo vietą, po įvykusios DNR hidrolizės gauti produktai buvo išgryninti ir nusekvenuoti (4B pav.). Nustatyta, kad CgII kerpa viršutinę už 7 ir apatinę DNR grandinę už 6/7 nukleotidų nuo 5'-GCCGC-3' atpažinimo sekos. Toks kirpimo profilis būdingas BfiI, kuri kerpa DNR, atitinkamai už 5 nukleotidų viršutinę ir už 4 nukleotidų apatinę grandinę nuo 5'-ACTGGG-3' atpažinimo sekos (Vitkute ir kt., 1998). Todėl galime teigti, kad R.CgII DNR kirpimo profilis yra panašus į IIS tipo fermentų DNR kirpimo profilį.

## 2.6. Funkcinis CgII kompleksas

Aukščiau pateikti eksperimentiniai duomenys rodo, kad R ir H baltymai sąveikauja tarpusavyje ir formuoja heterotetramerinį kompleksą, kuris būtinas ATP ir DNR hidrolizei. Remiantis kristaline R.NgoAVII struktūra (Tamulaitiene ir kt., 2014), gelfiltracijos bei SAXS duomenimis, pasiūlytas  $R_2H_2$ .CgII komplekso modelis (5 pav.). R.CgII dimerizuojasi per PLD domenus ir suformuoja aktyvų nukleazinį centrą. H.CgII dimerizuojasi per Z1 domenus, o DEAD domenai atsakingi už sąveiką su R.CgII.



**5 pav. CgII restrikcijos endonukleazė iš *Corynebacterium glutamicum*.** (A) R.CgII ir H.CgII baltymų domeninė organizacija. R.CgII turi PLD superšeimos nukleazinį ir B3 domenus panašų DNR surišimo domeną. H.CgII turi spėjamą SF2 helikazės/ATPazės domeną (DEAD), necharakterizuotą Z1 superšeimos domeną ir C-galinį domeną. Domenų ribos pažymėtos ar numeriais. (B) Spėjamas  $R_2H_2$ .CgII komplekso modelis. Homologinio R.NgoAVII baltymo dimero struktūra (PDB ID 4RCT) (Tamulaitiene ir kt., 2014) su specifine DNR, kurią suriša B3 domenai (PDB ID 4RD5) (Tamulaitiene ir kt., 2014) reprezentuoja R.CgII dimero struktūrą. Du R.NgoAVII PLD domenai dimerizuojasi (mėlynas ir šviesiai mėlynas) suformuodami vieną aktyvų centrą (aktyvaus centro H104 ir K106 ar. pažymėtos raudonai). B3 domenai (žalias ir šviesiai žalias) atpažįsta 5'-GCCGC-3' seką. DNR pavaizduota juodai. H.CgII subvienetą sudaro DEAD, Z1 ir C-galinis domenai (atskiri H.CgII subvienetai pavaizduoti balta arba pilka spalva).

Įdomu tai, kad CgII kerpa DNR fiksuotoje pozicijoje šalia taikinio kaip ir BfiI, bet tam reikia ATP hidrolizės, kuri greičiausiai naudojama translokacijai ant DNR. Tad kyla klausimas, kaip įvyksta DNR kirpimas šalia taikinio, jei baltymai translokuoja nuo atpažinimo sekų? Remiantis erdvine R.NgoAVII struktūra,  $R_2H_2$  kompleksas turi tik vieną aktyvų centrą. Tad atrodytų, kad du sąveikaujantys  $R_2H_2$  kompleksai yra reikalingi dvigrandinės DNR perkirpimui (greičiausiai vienas translokuojantis, kitas prisijungęs

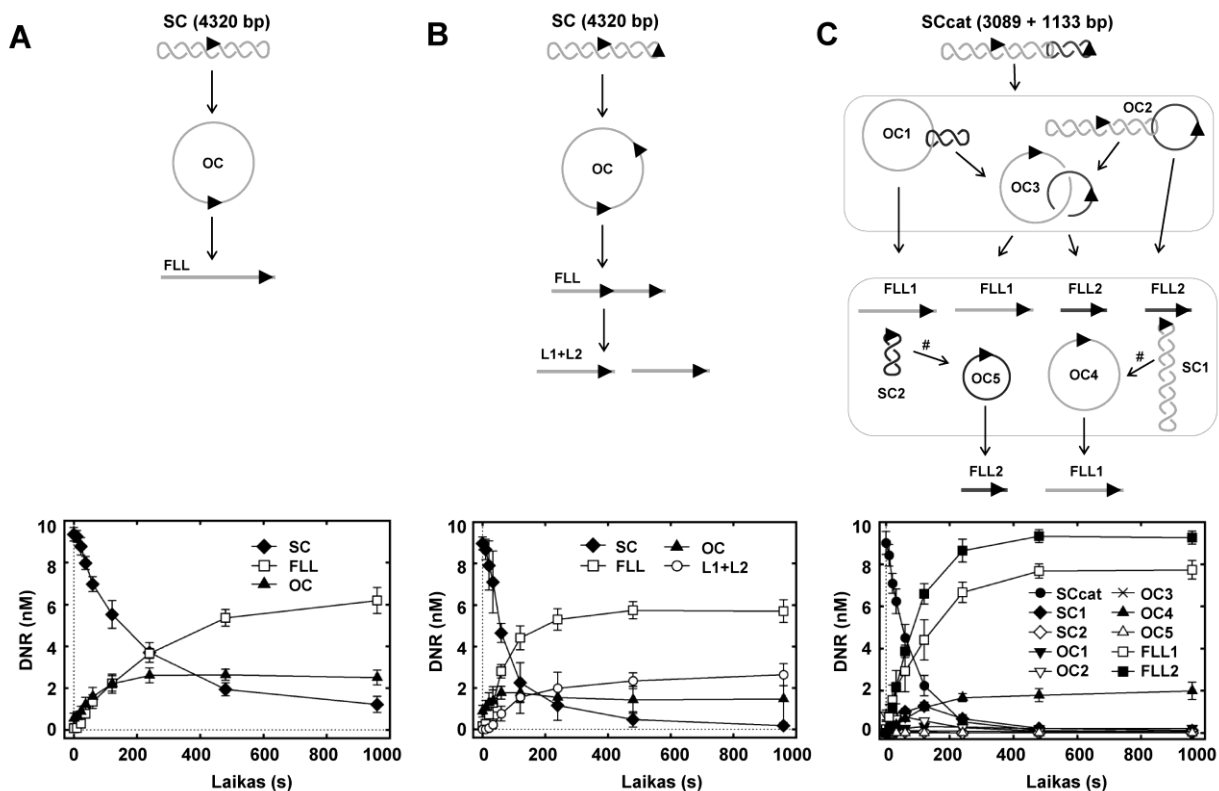
prie atpažinimo sekos). Tokiu būdu, kiekvienas kompleksas perkirptų po vieną DNR grandinę šalia taikinio. Toks kirpimo mechanizmas yra panašus į ISP ir III tipo fermentus, kurie naudoja atitinkamai translokaciją arba difuziją DNR molekule DNR kirpimui (van Aelst ir kt., 2015; van Aelst ir kt., 2010). Galimas CgII endonukleazės naudojamas komunikacijos mechanizmas DNR kirpimui aptariamas 3. skyriuje.

### **3. Nuo ATP priklausomos CgII restrikcijos endonukleazės DNR hidrolizės mechanizmo tyrimas**

#### **3.1. CgII naudoja vienmatę difuziją DNR hidrolizei**

Ankstesni tyrimai parodė, kad CgII baltymas pasižymi savybėmis, kurios nebūdingos nei vienam RM tipui (žr. 2. skyrius). Šiame skyriuje bus apžvelgiami DNR hidrolizės ir CgII baltymų komunikacijos mechanizmo tyrimai. Pagrindinis testas, kuris yra plačiai naudojamas I-III tipo RM fermentų atveju, atliekamas norint sužinoti, kiek reikia atpažinimo sekų, kad įvyktų DNR hidrolizė. Šis testas – tai endonukleazinio aktyvumo tyrimas panaudojant vieną ar du taikinius turinčias plazmidines DNR ar DNR katenanus (Embleton ir kt., 2001; Szczelkun ir kt., 1996b; Wood ir kt., 2005).

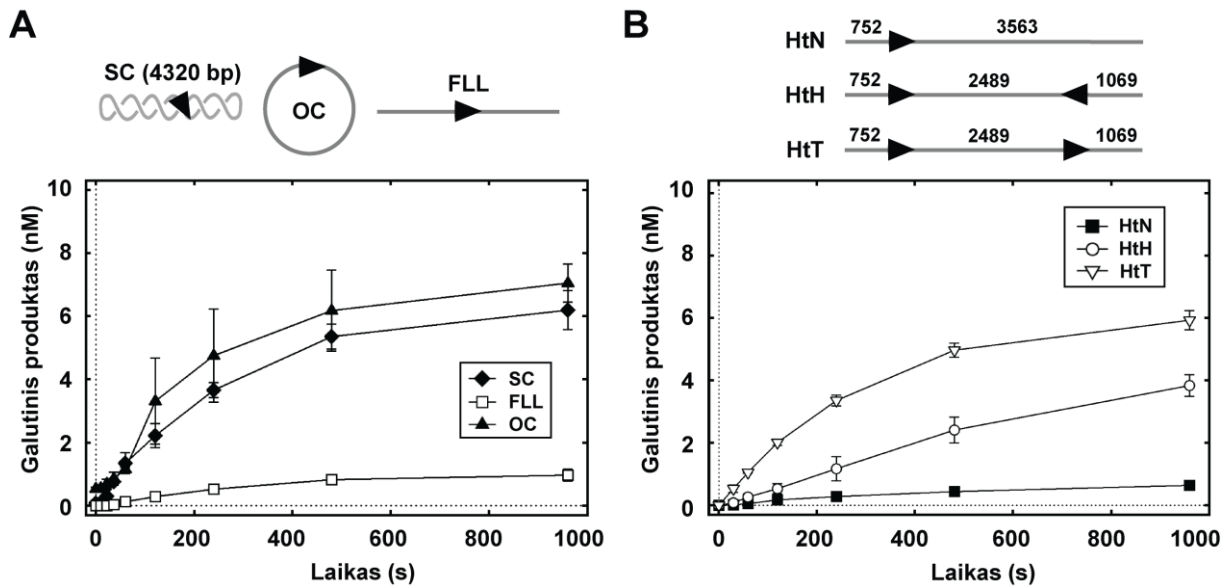
Pradžioje, buvo atlikta DNR hidrolizės kontrolė panaudojant plazmidinę 3105 bp DNR be CgII taikinių (Toliusis ir kt., 2017). Buvo stebimas tik DNR hidrolizės fonas, kas rodytų, kad DNR kirpimui reikia CgII atpažinimo sekos. Toliau DNR hidrolizė buvo tiriama panaudojant vieną ir du taikinius turinčias plazmidines DNR bei DNR katenaną (6 pav.) (Peakman ir kt., 2004). Gauti rezultatai parodė, kad vieną taikinį turinti plazmidinė DNR yra kerpama 2 kartus lėčiau nei du taikinius turinti plazmidinė DNR ar DNR katenanas. Tai rodo, kad efektyviai DNR hidrolizei reikia tik vieno CgII atpažinimo taikinio (6 pav. ir 5 lentelė). Nors gauti rezultatai pilnai neatsako į klausimą, ar CgII naudoja komunikacijos mechanizmą, būdingą I, ISP ir III tipo RM fermentams, tačiau parodo, kad antros atpažinimo sekos *in cis* (plazmidėje) ar *in trans* (katenane) buvimas neturi labai didelės įtakos plazmidinės DNR hidrolizės greičiui.



**6 pav.** Vieną taikinį turinčios plazmidės (A), du taikinius turinčios plazmidės (B) ir du taikinius turinčio katenano (C) hidrolizė. CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►). Tarpiniai ir galutiniai hidrolizės produktai pavaizduoti virš grafikų: SC – superspiralizuota žiedinė DNR (angl. supercoiled circular DNA), OC – įkirpta atvira žiedinė DNR (angl. open circle DNA), FLL – perkirpta linijinė DNR (angl. full-length linear DNA), L1+L2 – linijiniai DNR fragmentai perkirpti abiejuose CgII taikiniuose, SCcat – DNR katenanas (angl. SC catenane DNA), OC1 – įkirptas didžiajame žiede katenanas, OC2 – įkirptas mažajame žiede katenanas, OC3 – abiejuose žieduose įkirptas katenanas, OC4 – įkirpta didžioji plazmidė, OC5 – įkirpta mažoji plazmidė, FLL1 – perkirpta linijinė didžiojo žiedo DNR, FLL2 – perkirpta linijinė mažojo žiedo DNR. Reakcijose pridėta: 10 nM DNR, 4 mM ATP, 500 nM R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII. Greičių konstantų skaitinės reikšmės pateiktos 5 lentelėje. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

Jei DNR hidrolizėje dalyvautų tik vienas R<sub>2</sub>H<sub>2</sub> kompleksas, tai reakcijos pradžioje turėtume stebėti greitą įkirptos atviros žiedinės DNR susidarymą, kadangi kompleksas turėtų pakeisti konformaciją, kad galėtų perkirpti kitą DNR grandinę. Tačiau įkirptos atviros žiedinės DNR susidaro ne daugiau nei 25-30%, o galutinis produktas kaupiasi tik reakcijai prasidėjus. Todėl mes spėjame, kad DNR hidrolizėje dalyvauja du R<sub>2</sub>H<sub>2</sub> kompleksai (kiekvienas turi po vieną aktyvų centrą). Be to, gauti DNR hidrolizės rezultatai rodo, kad, skirtingai nei tetramerinės II tipo restrikcijos endonukleazės (Embleton ir kt., 2001; Szczelkun ir kt., 1996a), CgII baltymui nereikalinga sąveika su dviem atpažinimo sekomis, susidarant DNR kilpoms, kad įvyktų efektyvi DNR hidrolizė. Tad tikėtina, kad CgII naudoja vienmatį komunikacijos mechanizmą, t.y. translokaciją ar slinkimą/difuziją ant DNR molekulės.

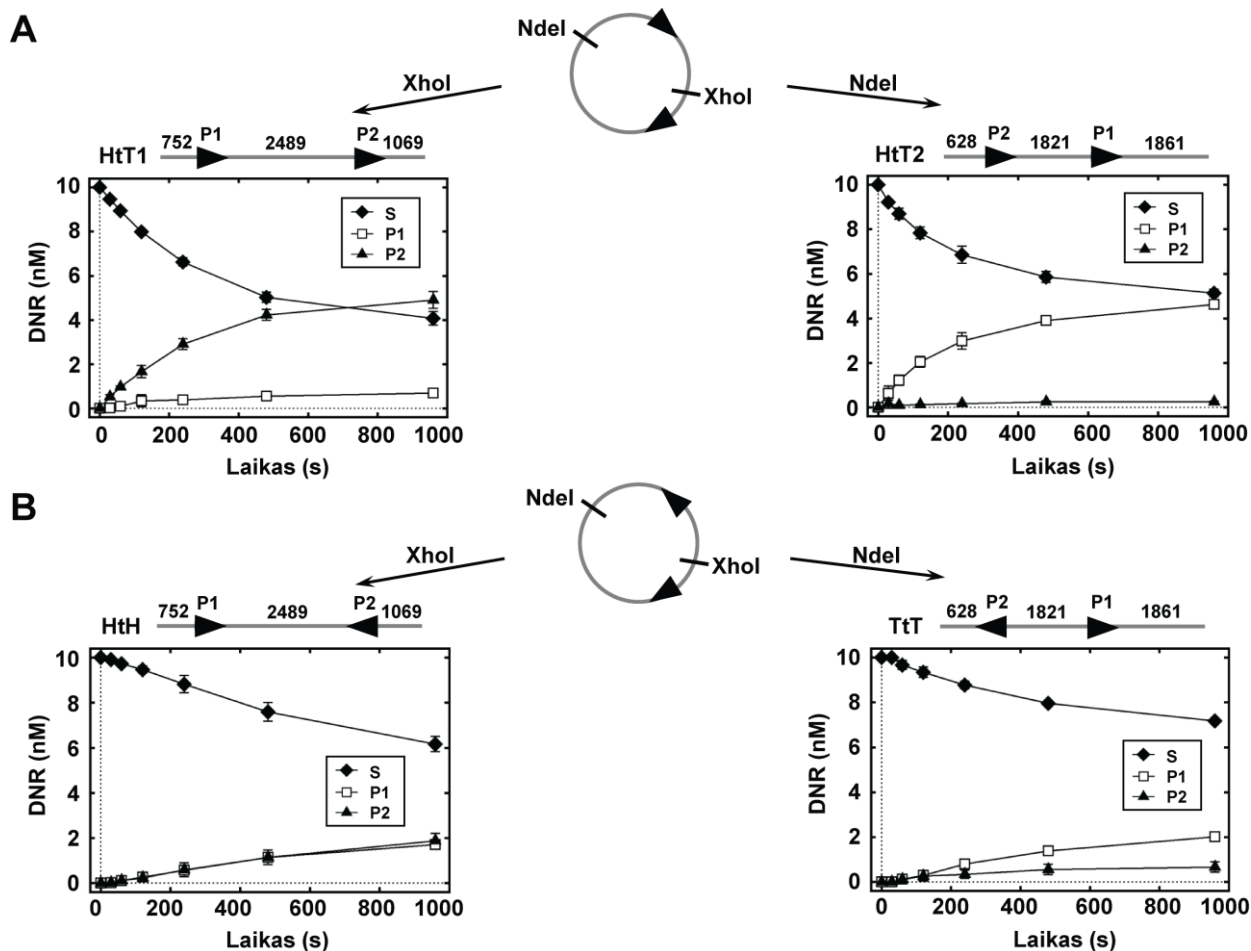
Kitame darbo etape mes tyrėme spėjamą CgII fermentų naudojamą vienmatį komunikacijos mechanizmą panaudojant skirtingų topologinių formų DNR substratus, gautus iš tos pačios vieną taikinį turinčios DNR: neigiamai superspiralizuota plazmidinė DNR, atvira žiedinė DNR ir linijinis DNR fragmentas (7A pav.).



**7 pav.** (A) SC, OC ir linijinės vieną taikinį turinčių plazmidinių DNR hidrolizė su CgII baltymais. CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►). Greičių konstantų skaitinės reikšmės ( $3,6 \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  – SC,  $3,0 \pm 0,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  – FLL ir  $4,2 \pm 0,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  – OC) gautos pritaikius vienos eksponentės funkciją substrato nykimui. (B) Linijinių vieną arba du taikinius turinčių DNR fragmentų karpymas su CgII baltymais. Skaičiais pažymėti atstumai tarp CgII atpažinimo sekų ir DNR galų. Greičių konstantų skaitinės reikšmės pateiktos 5 lentelėje. Visose reakcijose buvo 10 nM DNR, 4 mM ATP, 500 nM R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

Visais atvejais galutinių produktų susidarymo greičiai buvo praktiškai vienodi, tačiau linijinio fragmento atveju susidarė tik maža dalis galutinio produkto (7A pav. ir 5 lentelė). Tokie rezultatai yra būdingi I ir ISP tipo RM fermentams (Szczelkun ir kt., 1997; van Aelst ir kt., 2013) ir neprieštarauja vienmačiui komunikacijos mechanizmui. Mes spėjame, kad žiedinės DNR atveju vienas CgII kompleksas juda ratu DNR molekule ir susidūrus su kitu kompleksu, prisijungusiu prie atpažinimo sekos, įvyksta kirpimas. Toks mechanizmas esant linijiniam DNR fragmentui yra neefektyvus, kadangi kompleksai gali disocijuoti nuo DNR galų. Tačiau manome, kad maža dalis produktų susidaro dėl *in trans* sąveikų tarp CgII kompleksų, kurios nėra efektyvios. Galimas *in trans* komunikacijos mechanizmas aprašomas žemiau DNR translokacijos tyrimuose.

Vieną taikinį turintis linijinis fragmentas nėra efektyviai karpomas (7A ir B pav.), tačiau linijiniame fragmente esant dviem taikiniams karpymo efektyvumas padidėja. Tai vėlgi rodo, kad CgII galimai naudoja vienmatį komunikacijos mechanizmą DNR hidrolizei. Tokiu atveju DNR hidrolizės efektyvumas gali priklausyti nuo CgII atpažinimo sekos orientacijos, kas buvo stebima ISP ir III tipo RM fermentų atveju (Sisakova ir kt., 2013; van Aelst ir kt., 2010). Siekiant tai iširti mes panaudojome 4 skirtingus du taikinius turinčius linijinius DNR substratus: HtT1, HtT2, HtH ir TtT (8 pav.).



**8 pav. Linijinių DNR fragmentų su dvejais skirtingai orientuotais taikiniais karpymas esant CgII baltymams. (A) HtT substratų karpymas. (B). HtH ir TtT substratų karpymas. CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►), S žymi substratus, o P1 ir P2 atitinkamai žymi dvigrandinio trūkio vietą šalia P1 ir P2 taikinio. Skaičiais pažymėti atstumai tarp CgII atpažinimo sekų ir DNR galų. Visose reakcijose buvo 10 nM DNR, 4 mM ATP, 500 nM R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII. Greičių konstantų skaitinės reikšmės pateiktos 5 lentelėje. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis gautomis, iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.**

Eksperimentiniai duomenys parodė, kad linijinė DNR, kurioje taikiniai orientuoti ta pačia kryptimi (HtT1 arba HtT2), yra efektyviausiai hidrolizuojama, o kirpimo vieta dominuoja ties antru taikiniu (einantis už pirmo krypties atžvilgiu, 8 pav.). Gautos greičio konstantų skaitinės reikšmės artimos vieną taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizės atveju ( $\sim 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , 5 lentelė). Tai koreliuoja su priekis-galas susidūrimo mechanizmu, aktyvuojančiu DNR hidrolizę, ir kuris nėra būdingas I, ISP ar III tipo RM fermentams (Szczelkun, 2013; van Aelst ir kt., 2015). DNR hidrolizė stebima ir HtH bei TtT substratų atveju, kur taikiniai orientuoti į priešingas puses ( $\sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ), tačiau 10-kartų lėčiau nei HtT substratų atveju (8B pav. ir 5 lentelė). Nors DNR hidrolizė griežtai nepriklauso nuo taikinių orientacijos, kaip matoma ISP ir III tipo RM fermentų atveju, tačiau nežymi orientacijos priklausomybė stebima, kas nėra būdinga I tipo RM fermentams. Tai rodo kad CgII baltymai naudoja unikalų DNR hidrolizės mechanizmą.



## 5 lentelė. DNR hidrolizės greičių konstantos.

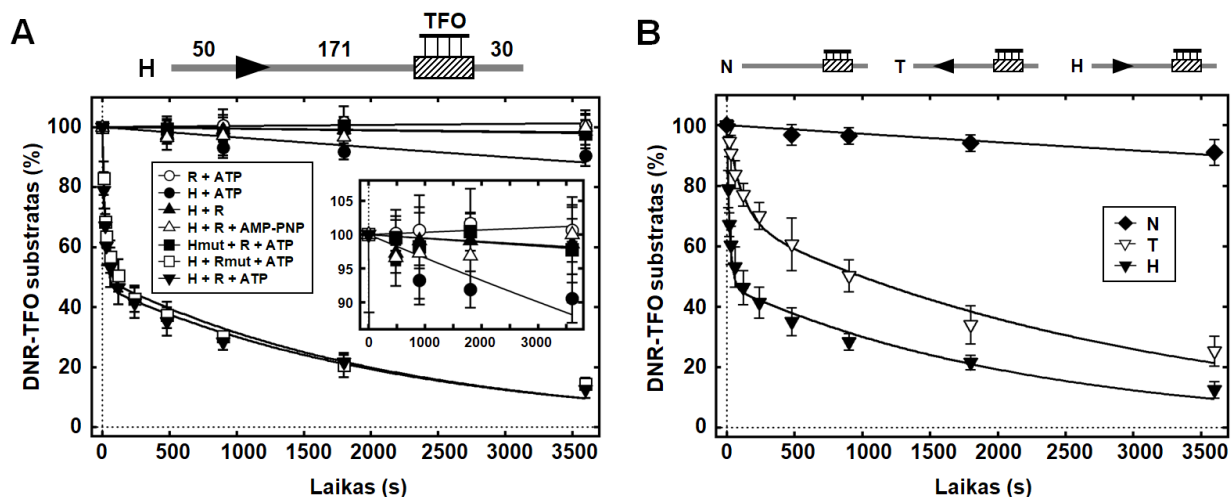
Paveikslas	DNR substratas	Greičio konstantos*, (s <sup>-1</sup> )
6A	vientaikininė SC	5,3 ± 0,3 × 10 <sup>-3</sup>
6B	dvitaikininė SC	1,1 ± 0,1 × 10 <sup>-2</sup>
6C	dvitaikininė SCcat	1,2 ± 0,1 × 10 <sup>-2</sup>
7A	vientaikininė SC	3,6 ± 0,2 × 10 <sup>-3</sup>
	vientaikininė OC	4,2 ± 0,7 × 10 <sup>-3</sup>
	vientaikininė FLL	3,0 ± 0,3 × 10 <sup>-3</sup>
7B	vientaikinis HtN DNR fragmentas	2,0 ± 0,3 × 10 <sup>-3</sup>
	dvitaikinis HtH DNR fragmentas	8,9 ± 1,9 × 10 <sup>-4</sup>
	dvitaikinis HtT DNR fragmentas	3,3 ± 0,1 × 10 <sup>-3</sup>
8A	dvitaikinis HtT1 DNR fragmentas	3,3 ± 0,1 × 10 <sup>-3</sup>
	dvitaikinis HtT2 DNR fragmentas	4,4 ± 0,4 × 10 <sup>-3</sup>
8B	dvitaikinis HtH DNR fragmentas	8,9 ± 1,9 × 10 <sup>-4</sup>
	dvitaikinis TtT DNR fragmentas	2,0 ± 0,2 × 10 <sup>-3</sup>

\*Greičio konstantų skaitinės reikšmės gautos pritaikius vienos eksponentės funkciją gautiems duomenims. DNR hidrolizės eksperimentai pakartoti tris kartus, o gautos skaitinės reikšmės grafikuose žymi vidurkius su standartiniais nuokrypiais. Greičių konstantų skaitinės reikšmės 9 ir 11 paveiksle žymi substrato nykimą, o 10 paveiksle – produkto susidarymą. SC – superspiralizuota žiedinė DNR (angl. supercoiled circular DNA), OC – įkirpta atvira žiedinė DNR (angl. open circle DNA, ‘nicked’), FLL – perkirpta linijinė DNR (angl. full-length linear DNA), SCcat – DNR katenanas (angl. SC catenane DNA), HtH – CgII taikiniai (5'-GCCGC-3') nukreipti vienas į kitą (angl. head-to-head), HtT – CgII taikiniai (5'-GCCGC-3') nukreipti į tą pačią pusę (angl. head-to-tail), TtT – CgII taikiniai (5'-GCCGC-3') nukreipti į priešingas puses (angl. tail-to-tail).

### 3.2. CgII naudoja dvikryptės DNR translokacijos mechanizmą

Remiantis DNR hidrolizės rezultatais (žr. 3.1 skyrius) ir tuo, kad CgII gausiai hidrolizuoja ATP, kaip ir I tipo RM fermentai, spėjame, kad CgII naudoja translokacijos mechanizmą DNR kirpimui. Šiai hipotezei patvirtinti mes panaudojome DNR triplekso nustūmimo metodą, taip pat žinomą kaip TFO (angl. triplex forming oligonucleotide) nustūmimo metodą, kuris plačiai naudojamas I ir ISP tipo RM fermentų tyrimuose (Seidel ir kt., 2005; Stanley ir kt., 2006). Gauti eksperimentiniai duomenys parodė, kad už CgII atpažinimo sekos esantis triplekso nustūmimas yra stebimas, kuomet tirpale yra ATP ir wt H.CgII subvienetas (9A pav.). H105A mutacija R.CgII subvieneto nukleaziniame HxK motyve (Rmut) įtakos neturėjo (9A pav.).

Norėdami išsiaiškinti ar CgII naudoja dvikryptę translokaciją, TFO nustūmimo eksperimentams mes panaudojome nespecifinį (be CgII taikinių) arba specifinį (su CgII taikiniu prieš tripleksą) DNR substratą (9B pav.). Esant nespecifiniam substratui, stebimas nežymus TFO nustūmimas, kuris greičiausiai nepriklauso nuo translokacijos (9B pav.). Specifinių substratų atveju, buvo stebimas dviejų fazių triplekso nustūmimo profilis (9B pav. ir 6 lentelė), tačiau stebimos skirtingos skirtingų fazių amplitudės ir skirtingi atskirų fazių reakcijų greičiai (9B pav. ir 6 lentelė). Šie rezultatai, kaip ir DNR hidrolizės atveju, rodo, kad CgII galimai naudoja du skirtingu efektyvumu pasižyminčius komunikacijos mechanizmus. Greitas triplekso nustūmimas (H substrato atveju) stebimas, kuomet CgII atpažinimo seka ir naudojama translokacija yra nukreipti į tą pačią pusę, ir lėtesnis (T substrato atveju) – kuomet CgII atpažinimo seka ir naudojama translokacija yra nukreipti į priešingas puses.



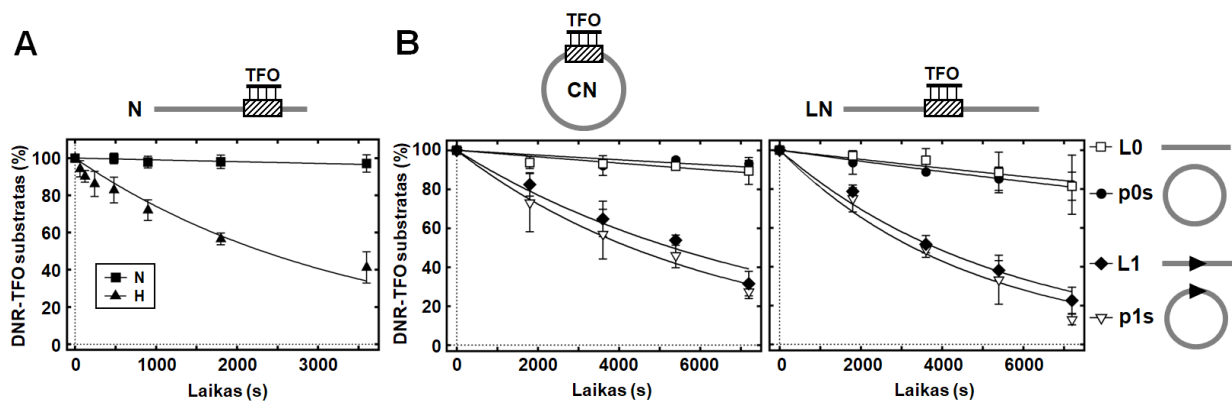
**9 pav. CgII translokazinis aktyvumas panaudojant DNR triplekso nustūmimo metodą.** (A) TFO nustūmimas esant CgII baltymams. Tyrimuose naudoti substratai parodyti virš grafikų: DNR pažymėta pilka linija, CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►), TFO prisijungimo vieta pavaizduota stačiakampiu, o skaičiai žymi atstumus (bp). Naudoti sutrumpinimai: H – H.CgII, R – R.CgII, Hmut – H.CgII (D158A + E159A) mutantas, Rmut – R.CgII (H105A) mutantas. Į grafiką įkeltame paveiksle yra priartinta grafiko dalis TFO nustūmimo skirtumams pamatyti. (B) TFO nustūmimo priklausomybė nuo CgII atpažinimo sekos. DNR substratai: N – DNR be atpažinimo sekos, T ir H DNR fragmentai turintys po vieną skirtingai orientuotą atpažinimo seką. Visose reakcijose buvo: 5 nM DNR, 2,5 nM TFO, 4 mM ATP, 200 nM R.CgII, 200 nM H.CgII. Juodos linijos žymi vienos ar dviejų eksponenčių funkcijas pritaikytas gautiems duomenims. TFO nustūmimo greičių konstantų skaitinės reikšmės pateiktos 6 lentelėje. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

### 3.3. CgII pasižymi translokaziniu aktyvumu *in trans* susidarant baltymų-DNR kompleksams

Aukščiau gautus rezultatus galima paaiškinti tuo, kad CgII naudoja dvikryptės DNR translokacijos mechanizmą, kur jos efektyvumas priklauso nuo translokacijos krypties. Kita hipotezė būtų ta, kad CgII naudoja tik vienkryptę DNR translokaciją, tačiau gali keisti kryptį, kurios metu translokacija vyksta lėčiau. Toks krypties pasikeitimas galimas fermentui palikus taikinį ir vėl prisijungus prie kito DNR taikinio toje pačioje ar kitoje DNR molekulėje. Be to,  $R_2H_2$  kompleksas turi du DNR surišimo domenus, tad yra galimybė, kad krypties pasikeitimas vyksta surišant papildomai antrą taikinį toje pačioje ar kitoje DNR molekulėje.

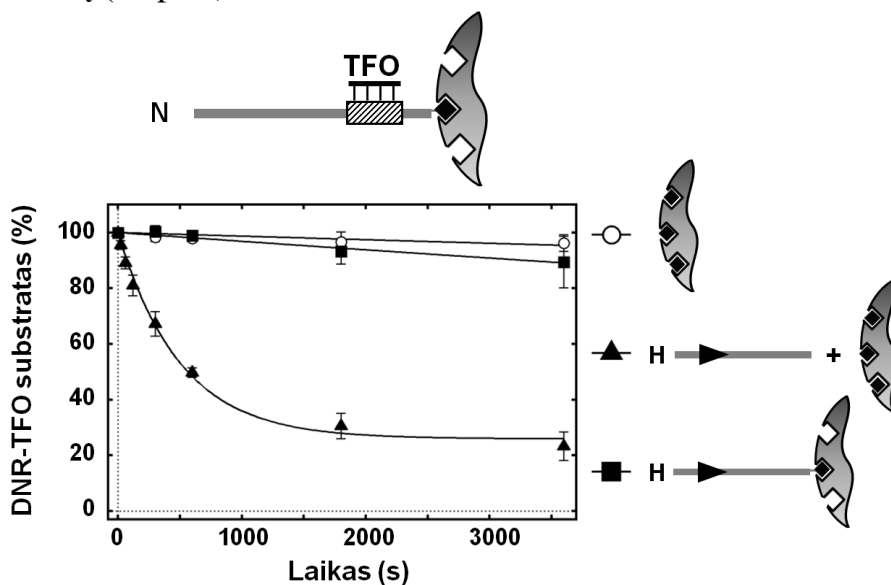
Pirmiausiai mes patikrinome, ar translokazinis variklis gali būti perneštas nuo vienos DNR molekulės ant kitos. Tripleksas nebuvo nustumiamas nuo linijinio DNR fragmento, kuriame nebuvo CgII atpažinimo sekos (10A pav.). Tačiau papildomai pridėjus linijinio DNR fragmento *in trans* su CgII atpažinimo seka („H“), tripleksas buvo nustumiamas nuo nespecifinio substrato (10A pav.). Mes pakartojome eksperimentą panaudodami suformuotą tripleksą su žiediniu arba linijiniu DNR substratu ir papildomai pridėdant žiedinės arba linijinės (ne-) specifinės DNR *in trans* (10B pav.). Triplekso nustūmimo aktyvacija buvo stebima visais atvejais, kur papildomai pridėti DNR fragmentai turėjo CgII atpažinimo seką. Be to, DNR galai neturi įtakos triplekso nustūmimo aktyvacijai *in trans* (10B pav.).





**10 pav. TFO nustūmimas *in trans*.** (A) TFO nustūmimas nuo linijinio DNR substrato (N) neturinčio CgII atpažinimo sekos (DNR ilgis – 278 bp). DNR substratas (DNR ilgis – 278 bp) parodytas virš grafiko. TFO prisijungimo vieta pavaizduota stačiakampiu. DNR pridėta *in trans* (DNR ilgis – 278 bp) tokia pati, kaip naudota 9B paveiksle. (B) TFO nustūmimas nuo žiedinės arba linijinės nespecifinės DNR. DNR substratai (DNR ilgis – 3383 bp) parodyti virš grafikų. CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►). DNR pridėta *in trans* (DNR ilgis – 3105 bp) yra linijinės (L0 ir L1) ir žiedinės (p0s ir p1s) formos be ir su CgII atpažinimo seka. Visose reakcijose buvo: 1 nM DNR substrato, 0,5 nM TFO, 4 mM ATP, 200 nM R.CgII (H105A), 200 nM H.CgII, 4 nM (A) arba 10 nM (B) DNR pridėta *in trans*. Juodos linijos žymi vienos eksponentės funkciją pritaikytą gautiems duomenims. TFO nustūmimo greičių konstantų skaitinės reikšmės pateiktos 6 lentelėje. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

Norėdami išsiaiškinti, ar *in trans* aktyvacija vyksta disociacijos/asociacijos metu, ar susidarant DNR kilpoms/DNR-baltymo kompleksui, atlikome triplekso nustūmimo eksperimentus, kur nespecifinė DNR buvo prijungta prie magnetinių dalelių. DNR-baltymo komplekso susidarymas yra erdviškai nepalankus, kuomet surišamos DNR molekulės yra prisijungusios prie skirtingų magnetinių dalelių (Gasiunas ir kt., 2008; Zaremba ir kt., 2010). Todėl bet koks helikazinio variklio pernešimas galimas tik tirpale, disociacijos/asociacijos būdu. Tam panaudojome biotinu pažymėtą nespecifinę linijinę DNR su suformuotu tripleksu, prijungtą prie streptavidinu padengtų magnetinių dalelių, ir specifinę linijinę DNR, prijungtą ar neprijungtą prie streptavidinu padengtų magnetinių dalelių (11 pav.).



**11 pav. DNR įmobilizacijos įtaka TFO nustūmimui *in trans*.** N, H ir T DNR fragmentai (DNR ilgis – 278 bp) tokie patys kaip naudoti 9B paveiksle. DNR pažymėta pilka linija, CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►), TFO prisijungimo vieta pavaizduota stačiakampiu, biotinas pažymėtas juodu rombu, o magnetinė dalelė – pilku pusskrituliu. Visose reakcijose buvo: 1 nM DNR substrato, 0,5 nM TFO, 4 mM ATP, 200 nM R.CgII, 200 nM H.CgII, 50 nM DNR *in trans* (tirpale arba įmobilizuota). Juodos linijos žymi vienos eksponentės funkciją, pritaikytą gautiems duomenims. TFO nustūmimo greičių konstantų skaitinės reikšmės pateiktos 6 lentelėje. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

Gauti rezultatai parodė, kad *in trans* aktyvacija nevyksta tirpale. Triplekso nustūmimas nebuvo stebimas, kai į reakcijos mišinį papildomai buvo pridėta DNR, įmobilizuota ant magnetinių dalelių. (11 pav.). Tačiau tripleksas buvo nustumiamas, kuomet reakcijos mišinyje buvo papildomai pridėta DNR, neįmobilizuota ant magnetinių dalelių (11 pav.). Tai rodo, kad CgII pasižymi translokaziniu aktyvumu *in trans*, kuomet jis suriša vienu metu specifinę ir nespecifinę DNR.

**6 lentelė. TFO nustūmimo greičių konstantos.**

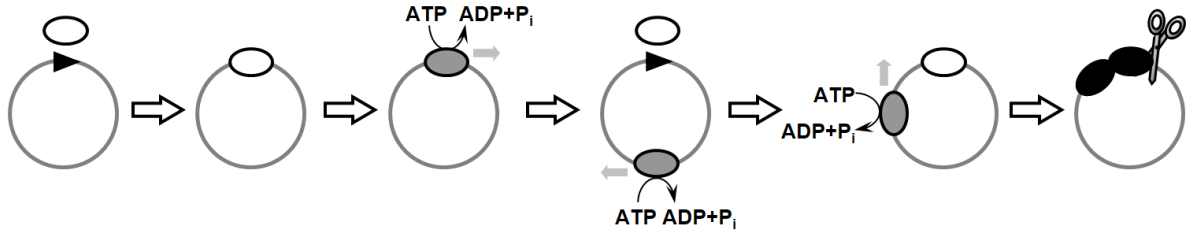
Paveikslas	Reakcija	DNR substratas	DNR <i>in trans</i>	Greičio konstantos *, (s <sup>-1</sup> )	
				$k_1$	$k_2$
9A	R + ATP	H	–	≈ 0	–
	H + ATP	H	–	$3,5 \pm 0,7 \times 10^{-5}$	–
	H + R	H	–	$5,0 \pm 3,1 \times 10^{-6}$	–
	H + R + AMP-PNP	H	–	$5,8 \pm 5,9 \times 10^{-6}$	–
	Hmut + R + ATP	H	–	$5,3 \pm 2,4 \times 10^{-6}$	–
	H + Rmut + ATP	H	–	$4,1 \pm 0,1 \times 10^{-2}$	$4,6 \pm 0,6 \times 10^{-4}$
	H + R + ATP	H	–	$4,5 \pm 0,1 \times 10^{-2}$	$4,4 \pm 0,5 \times 10^{-4}$
9B	H + R + ATP	N	–	$2,9 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	–
	H + R + ATP	T	–	$9,1 \pm 2,0 \times 10^{-3}$	$3,3 \pm 0,4 \times 10^{-4}$
	H + R + ATP	H	–	$4,5 \pm 0,1 \times 10^{-2}$	$4,4 \pm 0,5 \times 10^{-4}$
10A	H + R + ATP	N	N	$9,6 \pm 1,7 \times 10^{-6}$	–
	H + R + ATP	N	T	$2,6 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	–
	H + R + ATP	N	H	$3,0 \pm 0,3 \times 10^{-4}$	–
10B	H + Rmut + ATP	CN	L0	$1,7 \pm 0,2 \times 10^{-5}$	–
	H + Rmut + ATP	CN	p0s	$1,3 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	–
	H + Rmut + ATP	CN	L1	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	–
	H + Rmut + ATP	CN	p1s	$1,6 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	–
	H + Rmut + ATP	LN	L0	$2,4 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	–
	H + Rmut + ATP	LN	p0s	$2,9 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	–
	H + Rmut + ATP	LN	L1	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	–
	H + Rmut + ATP	LN	p1s	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	–
11	H + R + ATP	N (įmob.)	–	$1,3 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	–
	H + R + ATP	N (įmob.)	H	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{-3}$	–
	H + R + ATP	N (įmob.)	H (įmob.)	$3,2 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	–

\*Greičių konstantų skaitinės reikšmės gautos pritaikius vienos ar dviejų eksponentių funkcijas gautiems duomenims. TFO nustūmimo eksperimentai pakartoti ne mažiau kaip tris kartus, o gautos skaitinės reikšmės grafikuose žymi vidurkius su standartiniais nuokrypiais. Greičių konstantų skaitinės reikšmės visuose paveiksluose žymi triplekso substrato nykimą.

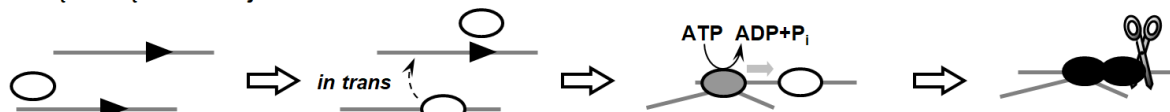
### 3.4. Spėjamas CgII veikimo mechanizmas

Remiantis gautais DNR hidrolizės ir translokacijos rezultatais pasiūlytas spėjamas DNR hidrolizės mechanizmas esant skirtingiems DNR substratams (12 pav.).

Vieną taikinį turinti žiedinė DNR



Vieną taikinį turinti linijinė DNR



Du taikinius (HtT) turinti linijinė DNR



**12 pav. Spėjamas CgII veikimo mechanizmas esant skirtingiems DNR substratams.** DNR pažymėta pilka linija, CgII atpažinimo seka (5'-GCCGC-3') pavaizduota juoda rodykle (►). Trys skirtingos R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII komplekso būsenos pavaizduotos atitinkamai: neaktyvuota – balta elipse, aktyvuota – pilka elipse ir translokuojanti – juoda elipse. Dėl aiškumo tik viena iš dviejų galimų translokacijos krypčių yra pavaizduota. Linijinių du taikinius turinčių substratų atveju tik HtT fragmento hidrolizė yra pavaizduota.

Pirmiausia, R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII kompleksas (balta elipsė), turintis tik vieną aktyvų centrą, prisijungia prie savo atpažinimo sekos, aktyvuojasi (pilka elipsė) ir naudodamas ATP hidrolizę palieka taikinį ir pradeda translokuoti ant DNR. Tuomet antras CgII kompleksas prisijungia prie tos pačios CgII atpažinimo sekos. Galiausiai įvyksta susidūrimas tarp besitranslokuojančio ir prie taikinio sekos prisijungusio kompleksų (juodos elipsės), tuomet DNR viršutinė grandinė yra perkerpama už 7, o apatinė už 6/7 nukleotidų nuo 5'-GCCGC-3' sekos. Vieną taikinį turinčio linijinio substrato atveju du CgII kompleksai (vienas prisijungęs prie taikinio, kitas aktyvuotas) sąveikauja vienas su kitu *in trans*, kol galiausiai dvigrandinis trūkis yra įvedamas šalia taikinio (neefektyvi hidrolizė). Du taikinius turinčio HtT linijinio substrato atveju CgII pasižymi dominuojančia translokacijos kryptimi (pažymėta pilka rodykle), o DNR kirpimas dažniausiai įvyksta ties antru taikiniu (einantis už pirmo krypties atžvilgiu).

## 4. Biocheminiai ir struktūriniai H.CgII subvieneto tyrimai

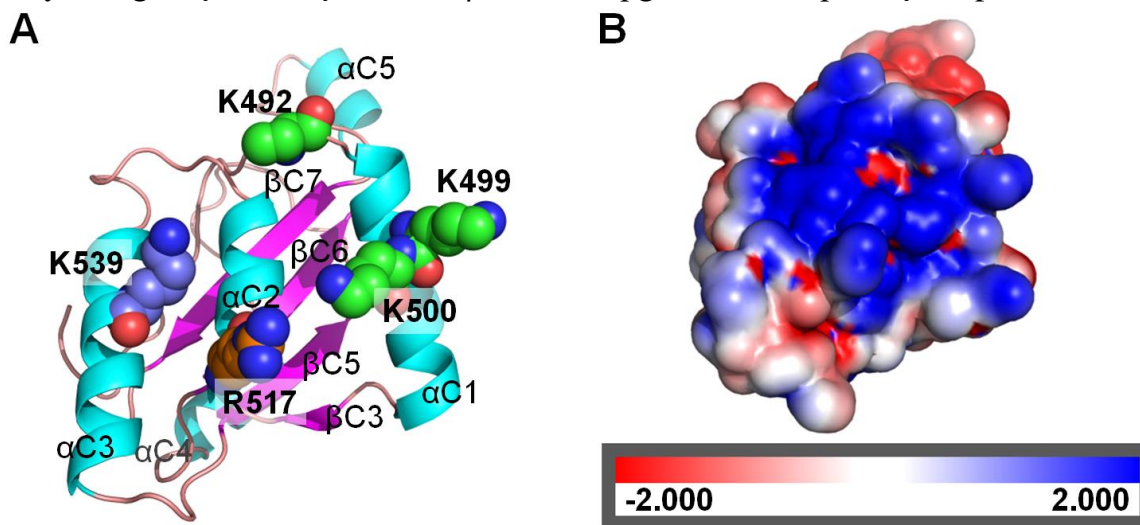
CgII baltymo 632 ar. H.CgII subvienetas turi 229 ar. SF2 helikazėms būdingą N-galinį domeną (DEAD domeną), necharakterizuotą 234 ar. Z1 superšeimos domeną – Z1 (Iyer ir kt., 2008) ir necharakterizuotą 169 ar. C-galinį domeną, kurio ar. seka nėra panaši į jokią kitą žinomos struktūros baltymą. H.CgII subvieneto DEAD domenai yra trumpesnis už tuos domenai, kurie sudaro SF2 helikazėms būdingą monomerinį

molekulinį variklį, aptinkamą I ir ISP tipo RM baltymuose. Jų ilgis paprastai siekia >400 ar. ir jie yra sudaryti iš dviejų atskirų N- ir C-centrinių į RecA panašių domenų (Singleton ir kt., 2007; Szczelkun, 2013). Todėl tikėtina, kad DEAD domenas greičiausiai yra vienas iš dviejų minėtų centrinių domenų. Be to, remiantis R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII kompleksu modeliu, spėjame, kad DEAD domenas yra N-centrinis į RecA panašus domenas, o gretimas Z1 domenas – C-centrinis į RecA panašus domenas.

Siekiant patvirtinti, kad CgII turi monomerinį DEAD-Z1 molekulinį variklį, būdingą SF2 helikazėms, mes atlikome struktūrinius (Rentgeno spindulių kristalografiją, molekulinį modeliavimą) ir biocheminius (DNR ir ATP surišimas, ATP hidrolizė, DNR hidrolizė) tyrimus panaudodami įvairius mutantinius baltymus.

#### 4.1. C-galinio domeno kristalinė struktūra

Siekiant detaliau suprasti H.CgII subvienete esančio SF2 helikazėms būdingo molekulinio variklio funkciją, mes bandėme iškristalinti pilno ilgio H.CgII baltymą, tačiau gauti kristalai difragavo Rentgeno spindulius nepakankama skiriamąja geba struktūros nustatymui. Tad buvo bandoma iškristalinti pavienius domenų ar jų kombinacijas. Buvo gauti DEAD ir Z1 domenų, bei sulietų DEAD-Z1 ir Z1-C domenų kristalai, tačiau visi jie nedifragavo Rentgeno spindulių. Tik C-galinio domeno kristalai difragavo Rentgeno spindulius aukšta skiriamąja geba, kurio erdvinę struktūrą pavyko nustatyti. C-galinį domeną sudaro 5 β klostės, apgaubtos 4 α spiralių (13 pav.).



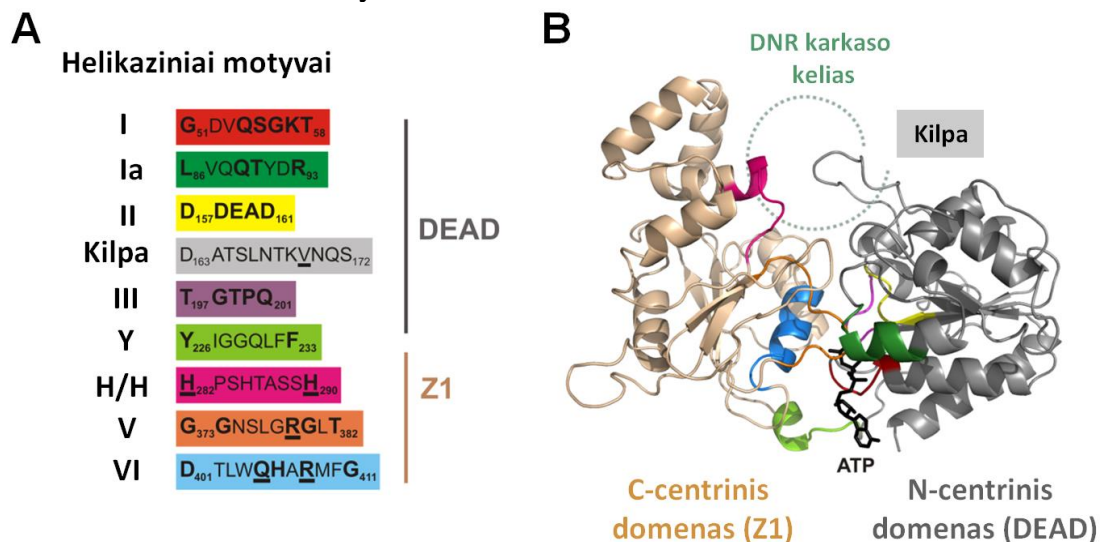
**13 pav. H.CgII C-galinio domeno kristalinė struktūra.** (A) C-galinio domeno struktūra. Spėjamos teigiamos aminorūgštys, dalyvaujančios DNR surišime, pavaizduotos rutuliukais. (B) C-galinio domeno elektrostatinis paviršius (domeno orientacija kaip A pav.).

Palyginus C-galinio domeno struktūrą panaudojant DALI serverį paaiškėjo, kad domenas turi unikalią sanklodą (Toliusis ir kt., 2018). C-galinio domeno elektrostatinio paviršiaus analizė parodė, kad domene yra teigiamų aminorūgščių (K492, K499, K500, R517, K539) paviršius, kuris yra būdingas su DNR sąveikaujantiems baltymams (13 pav.). Tačiau iki šiol nebuvo žinoma, ar šis domenas sąveikauja su DNR. Tolimesni C-galinio domeno biocheminiai tyrimai pateikti žemiau.

## 4.2. Struktūrinis helikazinio variklio DEAD-Z1 modelis

Siekiant geriau suprasti H.CgII domenų funkcijas, ypač Z1 domeno, mes atlikome H.CgII aminorūgščių sekos kompiuterinę analizę. Gauti duomenys parodė, kad Z1 domenas atitinka C-centrinį į RecA panašų domeną, randamą SF2 helikazėse, o DEAD domenas atitinka N-centrinį į RecA panašų domeną, kuris turi gerai žinomus ATP surišimo motyvus (I ir II helikaziniai motyvai). Tai rodo, kad H.CgII turi du į RecA panašius domenus, būdingus SF2 helikazėms, bei prie kurių yra prisijungęs unikalus C-galinis domenas. Nepavykus nustatyti DEAD, Z1 ir DEAD-Z1 domenų erdviųjų struktūrų, nusprendėme sumodeliuoti DEAD-Z1 domenų struktūrą kompiuteriniais metodais.

Siekiant identifikuoti konservatyvius aminorūgščių motyvus gautame modelyje, H.CgII subvieneto ar. seka buvo palyginta su kitais homologiniais H baltymais, o gauti palyginimai buvo analizuojami panaudojant WebLogo įrankį (Crooks ir kt., 2004). Iš viso buvo identifikuoti 6 įprasti helikaziniai motyvai (14A pav.): I, Ia, II ir III motyvai DEAD domene, ir V ir VI motyvai Z1 domene.



**14 pav. Spėjami helikaziniai motyvai ir helikazinio variklio DEAD-Z1 modelis.** (A) H.CgII helikaziniai motyvai identifikuoti remiantis homologinių H baltymų palyginimu (Toliusis ir kt., 2018). Konservatyvios ar. liekanos pajuodintos. Šiame darbe taškinėms mutacijoms pasirinktos ar. liekanos pabrauktos. (B) Helikazinio variklio DEAD-Z1 modelis. DEAD domenas nuspalvintas pilkai, Z1 domenas nuspalvintas auksine spalva. Motyvai nuspalvinti kaip A paveiksle. ATP pavaizduota juodai. Spėjamas DNR karkaso kelias translokacijos metu gautas remiantis SsoRad54-DNR komplekso struktūra (Durr ir kt., 2005), PDB ID 1Z63.

Taip pat DEAD ir Z1 domenų sandūroje buvo identifikuotas Y motyvas, aptinkamas ir restrikcijos endonukleazių motoriniuose subvienetuose (Murray, 2000). Be to, Z1 domene buvo nustatytas specifinis H/H motyvas, kuris iki šiol nebuvo aptiktas kitose helikazėse ar į helikazes panašiuose baltymuose (14A pav.). Struktūriškai H/H motyvo pozicija atitinka SF2 helikazių IV helikazinio motyvo poziciją, kuris dažniausiai dalyvauja sąveikoje su DNR/RNR. Todėl spėjame, kad H/H motyvas su DNR sąveikauja translokacijos metu.

Visi helikaziniai motyvai DEAD-Z1 modelyje yra išsidėstę tikėtiniuose pozicijose atsižvelgiant į jų vaidmenį (14B pav.). I ir II helikaziniai motyvai išsidėstę ATP surišimo kišenėje, o už II motyvo yra specifinė kilpa, būdinga ir H.CgII homologams. Remiantis



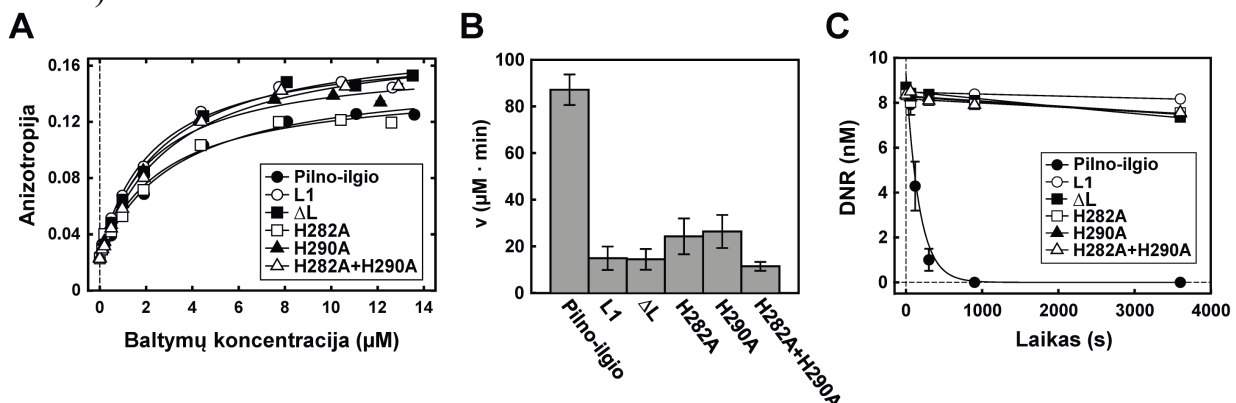
spėjama DNR pozicija, kilpa potencialiai galėtų sąveikauti su DNR translokacijos metu. Atitinkama kilpa randama ir DEAD-box helikazių šeimos SsoRad54 baltyme, kur ji dalyvauja nuo DNR priklausomoje ATPazinio aktyvumo reguliacijoje (Durr ir kt., 2005).

### 4.3. Helikazinių motyvų mutageninė analizė

Siekiant patvirtinti mūsų gautą helikazinio variklio DEAD-Z1 modelį, sudarytą iš dviejų į RecA panašių domenų, buvo išgryninti (>90% grynumas) pilno ilgio H.CgII baltymo mutantai: helikazinių motyvų mutantai – R379A (V motyvas), Q405A (VI motyvas) ir R408A (VI motyvas); H/H motyvo mutantai – H282A, H290A ir H282A + H290A; ir kilpos 163-172 mutantai – L1 (V169A), L3 (L165A + K168A + V169A) ir ΔL (165-172 ar. delecija). Remiantis gelfiltracijos duomenimis, visi H.CgII baltymo mutantai, išskyrus L3, sudarė heterotetramerinį R<sub>2</sub>H<sub>2</sub> kompleksą su wt R.CgII (Toliusis ir kt., 2018). Be to, mutacijos antrinėms struktūroms, išskyrus L3 mutantą, įtakos neturėjo (Toliusis ir kt., 2018). Todėl biocheminiai tyrimai su L3 mutantu nebuvo atlikti.

Norėdami įvertinti laukinio tipo H.CgII ir jo mutantų aktyvumą, mes atlikome tokius biocheminius tyrimus: (i) ATP-surišimas, įvertintas fluorescencijos anizotropijos būdu panaudojant Mant-ATP (Lemaire ir kt., 2006); (ii) ATP hidrolizės greičiai, gauti matuojant fosfato susidarymo greitį su „Malachite Green Phosphate Assay Kit“ rinkiniu (Sinkunas ir kt., 2011); (iii) DNR hidrolizė, panaudojant vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR; ir (iv) DNR surišimas, panaudojant 25 bp nespecifinį oligodupleksą.

Pirmiausiai atlikome kilpos ir H/H motyvo mutantų biocheminę analizę (15 pav.). Rezultatai parodė, kad visi H.CgII mutantai gebėjo rišti Mant-ATP panašiu efektyvumu (1,9-5,0 μM) kaip ir wt H.CgII (3,2 μM) (15 pav. ir 7 lentelė). Gautos K<sub>d</sub> konstantų skaitinės reikšmės būdingos ir kitiems DEAD-box šeimos baltymams, tokiems kaip RecG (K<sub>d</sub> ~4 μM, (Toseland ir kt., 2012)) ar NS3 (K<sub>d</sub> ~2 μM, (Frick ir kt., 2007)). R379A, Q405A ir R408A mutantai taip pat gebėjo rišti Mant-ATP, bet gautos anizotropijos pokyčio amplitudės buvo mažesnės lyginant su wt H.CgII baltymu (7 lentelė).



**15 pav. Kilpos ir H/H motyvo mutantų analizė.** (A) Mant-ATP surišimas įvertintas matuojant fluorescencijos anizotropiją. Gautoms anizotropijos reikšmėms pritaikyta hiperbolės funkcija. (B) ATP hidrolizės greičiai. Reakcijų mišiniuose buvo: 0,62 nM λ fago DNR (181 CgII taikiny), 10 nM H.CgII, 200 nM R.CgII, 2 mM ATP. (C) Vieną CgII taikinį turinčios plazmidinės DNR hidrolizė. DNR substrato nykimui pritaikyta vienos eksponentės funkcija. Gautų funkcijų konstantos (A-C paveikslai) pateiktos 7, 8 ir 9 lentelėje. Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

Tačiau visi mutantai pasižymėjo ženkliai mažesniu arba vos pastebimu ATPaziniu aktyvumu, o DNR hidrolizavo neženkliai arba hidrolizė išvis nebuvo stebima (15 pav., 8 ir 9 lentelė). Tai rodo, kad mutantai, nors ir geba surišti ATP, tačiau ryšys tarp ATP ir DNR hidrolizės yra nutraukiamas. Mes spėjame, kad H.CgII subvienete esantis VI motyvas tiesiogiai dalyvauja ATP hidrolizėje, kaip ir kitose helikazėse ar į helikazes panašiuose baltymuose, o struktūriniai motyvai, analogiški H.CgII subvieneto V motyvui ir kilpai 163-172, dalyvauja sąveikoje su DNR.

DNR surišimo tyrimai parodė, kad kilpos, helikazinių motyvų ir H/H motyvo mutantai bei wt H.CgII rišo DNR panašiu giminiu ( $K_d = 241-451$  nM, 10 lentelė). Kilpos ir H/H motyvo mutantų atveju ATP hidrolizės greitis sumažėjo nuo 3 iki 8 kartų, o DNR hidrolizavo >100 kartų lėčiau lyginant su laukinio tipo H.CgII baltymu. Todėl neatmetama galimybė, kad kilpa ir H/H motyvas dalyvauja ne tik sąveikoje su DNR, bet ir ATP hidrolizės aktyvumo reguliacijoje (9 ir 8 lentelė). Tačiau DNR surišimo tyrimai nepatvirtino, kad H/H motyvas dalyvauja DNR surišime (10 lentelė). Gali būti, kad jis dalyvauja sąveikoje su DNR translokacijos metu, ko mūsų naudotame DNR surišimo metode negalime stebėti.

**7 lentelė. H.CgII mutantų ir domenų susirišimas su Mant-ATP.**

Komentaras	Baltymas	$K_d^a$ , $\mu$ M	Santykis <sup>b</sup>
Pilno ilgio H.CgII			
–	WT	$3,2 \pm 0,4$	1
Kilpos mutantai	L1	$2,3 \pm 0,3$	0,7
	$\Delta$ L	$2,7 \pm 0,3$	0,8
H/H motyvo mutantai	H282A	$2,8 \pm 0,6$	0,9
	H290A	$2,2 \pm 0,3$	0,7
	H282A+H290A	$3,2 \pm 0,4$	0,9
V/VI motyvo mutantai	R379A	$4,0 \pm 0,7$	1,2
	Q405A	$1,9 \pm 0,4$	0,6
	R408A	$5,0 \pm 1,2$	1,5
H.CgII domenai			
–	DEAD	nėra susirišimo	–
	Z1	nėra susirišimo	–
	DEAD-Z1	$3,7 \pm 0,3$	–

<sup>a</sup>Mant-ATP disociacijos konstantų skaitinės reikšmės gautos pritaikius hiperbolės funkciją.

<sup>b</sup>Santykis tarp mutantinio baltymo susirišimo su Mant-ATP specifškumo ir laukinio baltymo susirišimo su Mant-ATP specifškumo ( $K_{d(\text{mutantas})}/K_{d(\text{wt})}$ ).

<sup>c</sup>Mūsų eksperimentinėmis sąlygomis Mant-ATP surišimas nebuvo stebimas.

### 8 lentelė. ATP hidrolizės greičiai.

Komentaras	Baltymas	Greitis <sup>a</sup> , $v$ ( $\mu\text{M} \times \text{min}^{-1}$ )	Santykis <sup>b</sup>
Pilno ilgio H.CgII ir R.CgII			
–	WT	$87 \pm 7$	1
C-galinio domeno paviršiaus mutantai	R517E	$68 \pm 6$	1,3
	K539E	$21 \pm 5$	4,1
	3M	$60 \pm 10$	1,5
Kilpos mutantai	L1	$15 \pm 5$	5,8
	$\Delta\text{L}$	$14 \pm 4$	6,2
H.CgII be vieno C-galinio domeno	$\Delta\text{C}$ -domenas	$17 \pm 2$	5,1
H/H motyvo mutantai	H282A	$24 \pm 8$	3,6
	H290A	$26 \pm 7$	3,3
	H282A+H290A	$11 \pm 2$	7,9
V/VI motyvo mutantai	R379A	$0,4 \pm 1$	218
	Q405A	$0,3 \pm 1$	290
	R408A	$0,7 \pm 1$	124

<sup>a</sup>ATP hidrolizės greičiai gauti remiantis santykiu tarp absorbcijos ir susidariusio fosfato koncentracijos.

<sup>b</sup>Santykis tarp laukinio ir mutantinio baltymo aktyvumo ( $v_{(\text{wt})}/v_{(\text{mutantas})}$ ).

### 9 lentelė. DNR hidrolizės greičiai.

Komentaras	Baltymas	Greičio konstanta <sup>a</sup> , $k_1$ ( $\text{s}^{-1}$ )	Santykis <sup>b</sup>
–	WT	$5,8 \pm 1,2 \times 10^{-3}$	1
C-galinio domeno paviršiaus mutantai	R517E	$5,1 \pm 0,9 \times 10^{-3}$	1,1
	K539E	$4,2 \pm 1,3 \times 10^{-3}$	1,4
	3M	$3,0 \pm 0,6 \times 10^{-3}$	1,9
Kilpos mutantai	L1	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	580
	$\Delta\text{L}$	$4,2 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	138
H.CgII be vieno C-galinio domeno	$\Delta\text{C}$ -domenas	$1,0 \pm 0,1 \times 10^{-4}$	58
H/H motyvo mutantai	H282A	$2,3 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	252
	H290A	$2,8 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	207
	H282A+H290A	$2,8 \pm 0,1 \times 10^{-5}$	207
V/VI motyvo mutantai	R379A	nėra hidrolizės	–
	Q405A	nėra hidrolizės	–
	R408A	nėra hidrolizės	–

<sup>a</sup>Greičio konstantų skaitinės reikšmės gautos superspiralizuotos plazmidinės DNR nykimui pritaikius vienos eksponentės funkciją.

<sup>b</sup>Santykis tarp laukinio ir mutantinio baltymo aktyvumo ( $k_{1(\text{wt})}/k_{1(\text{mutantas})}$ ).



**10 lentelė. Baltymų-DNR kompleksų disociacijos konstantos ( $K_d$ ).**

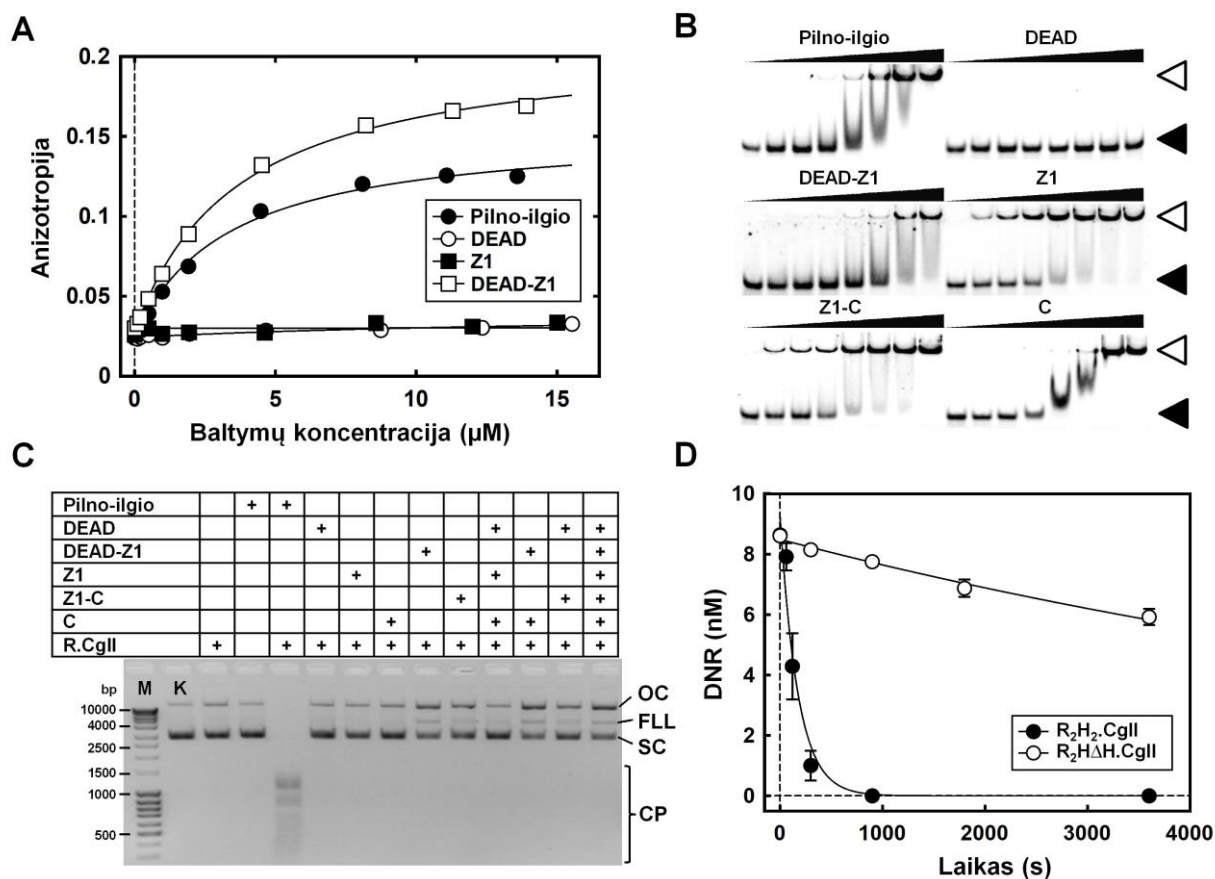
Komentaras	Baltymas	$K_d^a$ , nM	Santykis <sup>b</sup>
Pilno ilgio H.CgII			
–	WT	307 ± 78	1
C-galinio domeno paviršiaus mutantai	R517E	227 ± 38	0,7
	K539E	478 ± 80	1,6
	3M	728 ± 124	2,4
Kilpos mutantai	L1	292 ± 75	1
	ΔL	241 ± 63	0,8
H/H motyvo mutantai	H282A	451 ± 51	1,5
	H290A	440 ± 45	1,4
	H282A+H290A	360 ± 32	1,2
V/VI motyvo mutantai	R379A	321 ± 32	1
	Q405A	389 ± 48	1,3
	R408A	313 ± 28	1
H.CgII wt domenai			
–	DEAD	nėra susirišimo	–
	DEAD-Z1	844 ± 112	–
	Z1-C	56 ± 13	–
Z1 domenai			
–	WT	84 ± 7	1
H/H motyvo mutantas	H282A+H290A	99 ± 15	1,2
C domenai			
–	WT	269 ± 121	1
Paviršiaus mutantai	R517E	712 ± 194	2,6
	K539E	1063 ± 238	4,0
	3M	676 ± 213	2,5

<sup>a</sup>Disociacijos konstantų skaitinės reikšmės gautos pritaikius kvadratinę funkciją.

<sup>b</sup>Santykis tarp mutantinio baltymo susirišimo su DNR specifiskumo ir laukinio baltymo susirišimo su DNR specifiskumo ( $K_{d(\text{mutantas})}/K_{d(\text{wt})}$ ).

#### 4.4. H.CgII subvieneto domenų aktyvumo tyrimai

Remiantis homologiniu DEAD-Z1 modeliu (14 pav.) ir C-galinio domeno kristaline struktūra (13 pav.) spėjame, kad skirtingi domenai ar jų kombinacijos pasižymi skirtingomis ATP ir/ar DNR surišimo savybėmis. DEAD ir Z1 domenai yra panašūs į centrinius RecA domenų, kurie turėtų formuoti ATP surišimo kišenę, todėl spėjama, kad ATP surišeime dalyvauja abu DEAD ir Z1 domenai, o C-galinis domenas tam nereikalingas. Be to, DEAD, Z1 ir C-galinis domenai turi požymius, kurie leistų manyti, kad visi domenai galėtų dalyvauti surišant DNR. Tai galėtų paaiškinti, kodėl mutantiniai H.CgII baltymai panašiai riša DNR kaip ir laukinio tipo H.CgII. Siekiant patikrinti šias hipotezes mes atlikome ATP ir DNR surišimo tyrimus su H.CgII baltymo domenais (16A ir B pav.).



**16 pav. H.CgII baltymo domenų funkcinė analizė.** (A) Mant-ATP susirišimas su pilno ilgio H.CgII ir jo domenais, įvertintas matuojant fluorescencijos anizotropiją. Gautoms anizotropijos reikšmėms pritaikyta hiperbolės funkcija. (B) DNR susirišimas su pilno ilgio H.CgII ir jo domenais. Reakcijų mišiniuose buvo: 1 nM <sup>33</sup>P-žymėto oligoduplekso ir pridėta baltymų, palaipsniui didinant jų koncentraciją (nM): 0, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ir 5000. Pilnaviduriai ir tuščiaviduriai trikampiai atitinkamai žymi nesurištą DNR ir baltymo-DNR kompleksą. (C) 21 CgII taikinių turinčios plazmidinės pBR322 DNR hidrolizė 1 val. 37°C esant įvairiems baltymų mišiniams (kaip pavaizduota paveiksle). M – markeris (žinomų ilgių DNR fragmentai), K – kontrolė (plazmidinė pBR322 DNR), SC – superspiralizuota žiedinė DNR (angl. supercoiled circular DNA), OC – įkirpta atvira žiedinė DNR (angl. open circle DNA, ‘nicked’), FLL – perkirpta linijinė DNR (angl. full-length linear DNA), CP – hidrolizės produktai (angl. cleavage products). (D) Vieną CgII taikinių turinčios plazmidinės DNR hidrolizė su laukinio tipo wt R<sub>2</sub>H<sub>2</sub>.CgII ir R<sub>2</sub>HΔH.CgII (vienas H.CgII subvienetas neturi C-galinio domeno) kompleksais. DNR substrato nykimui pritaikyta vienos eksponentės funkcija. Gautų funkcijų konstantos (A, B ir D paveikslai) pateiktos 7, 10 ir 9 lentelėse). Taškai žymi vidurkines reikšmes su standartinio nuokrypio paklaidomis, gautomis iš ne mažiau nei trijų pakartojimų.

Fluorescencijos anizotropijos pokyčiai parodė, kad Mant-ATP suriša pilno ilgio H.CgII ir sulieti DEAD-Z1 domenai, tačiau pavieniai DEAD ir Z1 neriša Mant-ATP (16A pav.). Gautos  $K_d$  konstantų skaitinės reikšmės yra labai panašios pilno ilgio H.CgII ir sulietų DEAD-Z1 domenų atveju (atitinkamai  $K_d = 3,2$  ir  $3,7 \mu\text{M}$ ) (7 lentelė). Gauti rezultatai patvirtina gautą modelį 14B paveiksle, kuriame DEAD-Z1 domenai sudaro savarankiškai veikiančią pilną helikazinį variklį.

DNR surišimo tyrimai parodė, kad H.CgII sąveikauja su nespecificine DNR tik esant aukštesnėms baltymo koncentracijoms. DNR surišimas taip pat buvo stebimas ir

pavienių Z1 ir C-galinio domenų atveju bei sulietų DEAD-Z1 ir Z1-C domenų atveju, tačiau nebuvo stebimas DEAD domeno atveju (16B pav.). Apibendrinant gautus rezultatus galime teigti, kad Z1 ir C-galinis domenai yra atsakingi už sąveiką su DNR. Pagal gautą modelį buvo spėjama, kad DEAD domene esanti kilpa turėtų sąveikauti su DNR, tačiau mes nestebėjome DEAD domeno susirišimo su DNR. Gali būti, kad ši sąveika yra trumpalaikė translokacijos metu, kurios negalime stebėti mūsų naudotame DNR surišimo tyrimo metode nesant ATP. Be to, Z1 domeno H/H mutantas rišo DNR taip pat gerai kaip ir laukinio tipo Z1 domenas ( $K_d = 99$  nM) (10 lentelė). Vėlgi neatmetama galimybė, kad H/H motyvas sąveikauja su DNR tik translokacijos metu.

Remiantis C-galinio domeno struktūra bei gebėjimu rišti DNR, kitame etape mes išmutavome ar. liekanas, esančias teigiamai įkrautame paviršiuje (13 pav.) tiek pilno ilgio H.CgII subvienete, tiek C-galiniame domene: R517E, K539E ir 3M (K492E+K499E+K500E). Mes tyrėme DNR surišimą, ATPazinį ir nukleazinį aktyvumus. DNR surišimo tyrimai parodė, kad mutacijos susilpnina DNR susirišimą su C-galiniu domenu (didžiausias sumažėjimas ~4 kartus buvo stebimas K539E mutanto atveju) (10 lentelė). Mutantų ATP hidrolizės greičiai tik nežymiai sumažėjo (didžiausias sumažėjimas ~4 kartus buvo stebimas K539E mutanto atveju). Mutantų DNR hidrolizės greičiai visais atvejais buvo panašūs kaip ir laukinio baltymo atveju (9 lentelė). Gauti rezultatai patvirtino, kad C-galinio domeno teigiamai įkrautas paviršius dalyvauja DNR surišime bei yra svarbus ATP ir DNR hidrolizėje.

Kitame darbo etape mes pabandėme atstatyti pilną restrikcijos endonukleazės aktyvumą sumaišius H.CgII subvieneto atskirus ar sulietus domenus su pilno ilgio R.CgII. Baltymus galutiniame reakcijos mišinyje sumaišėme santykiu 1:1 ir tyrėme jų nukleazinį aktyvumą ant plazmidinės pBR322 DNR (turi 21 CgII taikinių) inkubuojant 1 val. 37°C temperatūroje (16C pav.). Nors nežymi DNR hidrolizė buvo stebima kai kurių baltymų mišinių atveju, tačiau efektyviai DNR hidrolizavo tik pilno ilgio H.CgII ir pilno ilgio R.CgII baltymų mišinys. Apibendrinant gautus rezultatus galime teigti, kad visi H.CgII subvienete esantys domenai (DEAD, Z1 ir C-galinis) yra reikalingi CgII restrikcijos fermento aktyvumui.

Remiantis eksperimentiniais duomenimis ir gautu modeliu, CgII turi du atskirus helikazinius variklius (po vieną kiekviename H.CgII subvienete) (5 pav.). Tačiau nėra aišku, kodėl CgII yra aktyvi kaip tetrameras su dvejais helikaziniais varikliais. Siekiant atsakyti į šį klausimą, mes išgryninome tetramerinį  $R_2H_2.CgII$  kompleksą be vieno C-galinio domeno ( $R_2H\Delta H.CgII$ ). Stebėtina, šis kompleksas hidrolizavo ATP >5 kartus lėčiau (8 lentelė), o vieną taikinį turinčią plazmidinę DNR perkirpo net ~60 kartų lėčiau lyginant su laukinio tipo kompleksu (16D pav. ir 9 lentelė). Tai rodo, kad C-galiniai domenai abiejuose pilno ilgio H.CgII subvienetuose yra reikalingi efektyviai ATP ir DNR hidrolizei.

Apibendrinant šiame darbe gautus rezultatus, galime teigti, kad CgII restrikcijos endonukleazė negali būti priskirta I, ISP ar III tipo RM fermentams. Skiriasi ne tik CgII struktūra, bet ir jos spėjamas veikimo mechanizmas nuo minėtų restrikcijos fermentų. Remiantis gausia ATP hidrolize ir naudojamu komunikacijos mechanizmu (translokacija ant DNR), CgII restrikcijos endonukleazė yra panašiausia į I tipo fermentus.

## IŠVADOS

1. Restrikcijos endonukleazės subvienetas R.CgII kerpa CgII atpažinimo sekose nemetilintą dvigrandinę DNR tik reakcijos mišinyje esant kataliziškai aktyviam ATPazės subvienetui H.CgII ir ATP. Šie R.CgII ir H.CgII baltymai formuoja heterotetramerinį  $R_2H_2.CgII$  kompleksą, kuris kerpa viršutinę grandinę už 6 ir apatinę grandinę už 6-7 nukleotidų nuo atpažinimo sekos 5'-GCCGC-3'.
2. H.CgII subvienetas yra ATPazė, kurios optimaliam kataliziniam aktyvumui pasireikšti būtini restrikcijos endonukleazės R.CgII subvienetai ir ilgas CgII atpažinimo sekose nemetilintas dvigrandinis DNR fragmentas. H.CgII subvieneto C-galinis domenas turi unikalią sanklodą ir teigiamai įkrautą paviršių, kuris sąveikauja su DNR. Šis domenas, įeinantis į abiejų H.CgII subvienetų sudėtį  $R_2H_2.CgII$  komplekse, yra būtinas komplekso kataliziniam aktyvumui.
3. H.CgII turi konservatyvius motyvus, būdingus SF2 helikazių superšeimai, ir kurie yra į helikazes panašiam DEAD-Z1 variklyje. DEAD domenas yra į RecA panašaus helikazinio variklio N-centrinis domenas, o Z1 domenas yra į RecA panašus C-centrinis domenas. Z1 domene yra iki šiol necharakterizuotas H/H motyvas, kuris gali būti atsakingas už DNR translokacijos/hidrolizės priklausomybę nuo ATP hidrolizės.
4. CgII restrikcijos endonukleazė dvigrandinės DNR hidrolizei naudoja dvikryptį komunikacijos mechanizmą. Šis komunikacijos mechanizmas – tai nuo ATP hidrolizės priklausoma DNR translokacija. DNR translokazinis aktyvumas, pasižymintis mažesniu efektyvumu, gali būti perneštas ant gretimos nespecifinės DNR, kuomet CgII suriša specifinę ir nespecifinę DNR molekule.

# MOKSLINIŲ DARBŲ SĄRAŠAS

## Disertacijoje pateikta medžiaga paskelbta šiuose moksliniuose straipsniuose:

1. Zaremba, M., **Toliusis, P.**, Grigaitis, R., Manakova, E., Silanskas, A., Tamulaitiene, G., Szczelkun, M.D. and Siksnys, V. (2014) DNA cleavage by CgII and NgoAVII requires interaction between N- and R-proteins and extensive nucleotide hydrolysis. *Nucleic Acids Res*, 42, 13887-13896, <https://doi.org/10.1093/nar/gku1236>
2. **Toliusis, P.**, Zaremba, M., Silanskas, A., Szczelkun, M.D. and Siksnys, V. (2017) CgII cleaves DNA using a mechanism distinct from other ATP-dependent restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, 45, 8435–8447, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx580>
3. **Toliusis, P.**, Tamulaitiene, G., Grigaitis, R., Tuminauskaite, D., Silanskas, A., Manakova, E., Venclovas, C., Szczelkun, M.D., Siksnys, V. and Zaremba, M. (2018) The H-subunit of the restriction endonuclease CgII contains a prototype DEAD-Z1 helicase-like motor, *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2560–2572, <https://doi.org/10.1093/nar/gky107>

## Disertacijoje pateikta medžiaga buvo pristatyta šiose konferencijose:

1. **P. Toliusis**, M. Zaremba, A. Silanskas, and V. Siksnys. ATP-dependent endonuclease of a stress-sensitive restriction-modification system from *Corynebacterium glutamicum*. XIII<sup>th</sup> international conference of Lithuanian Biochemical Society, Birštonas, Lithuania, 2014.06.17-20.
2. **P. Toliusis**, M. Zaremba, A. Šilanskas ir V. Šikšnys. Nuo ATP priklausoma netipinė restrikcijos endonukleazė iš *Corynebacterium glutamicum* kamieno. Penktoji jaunųjų mokslininkų konferencija, Vilnius, Lietuva, 2015.02.10.
3. M. Zaremba, **P. Toliusis**, A. Silanskas, E. Manakova, M. Szczelkun, and V. Siksnys. DNA cleavage by CgII requires assembly of a heterotetramer of R- and H-proteins and extensive ATP hydrolysis. The Seventh NEB Meeting on DNA Restriction and Modification, Gdansk, Poland, 2015.08.24-29.
4. M. Zaremba, **P. Toliusis**, A. Silanskas, E. Manakova, M. D. Szczelkun and V. Siksnys. DNA cleavage by CgII requires assembly of a heterotetramer of R- and H-proteins and extensive ATP hydrolysis. Vita Scientia, Vilnius, Lithuania, 2016.01.04.
5. **P. Toliusis**, M. Zaremba, A. Silanskas, M. Szczelkun and V. Siksnys. CgII cleaves DNA using a mechanism distinct to other ATP-dependent restriction endonucleases. 42<sup>nd</sup> FEBS congress, Jerusalem, Israel, 2017.10.10-14.
6. **P. Toliusis**, G. Tamulaitiene, R. Grigaitis, D. Tuminauskaite, A. Silanskas, E. Manakova, C. Venclovas, M. D. Szczelkun, V. Siksnys and M. Zaremba. The H-subunit of the restriction endonuclease CgII contains a prototype DEAD-Z1 helicase like motor. Vita Scientia, Vilnius, Lithuania, 2018.01.02.

# CURRICULUM VITAE

<b>Vardas, Pavardė</b>	Paulius Toliušis
<b>Gimimo data</b>	1988 08 09
<b>Darbo adresas</b>	Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius (V343 kab.) Biotechnologijos institutas Vilniaus Universiteto Gyvybės mokslų centras Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius
<b>Telefonai</b>	+370 5 2234366 (darbo) +370 651 69796 (asmeninis)
<b>Faksas</b>	+370 5 2234367 (darbo)
<b>E-paštas</b>	paulius.toliusis@bti.vu.lt
<b>Išsilavinimas</b>	
2007-2011	Biochemijos bakalauras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
2011-2013	Biochemijos magistras Vilniaus universitetas (Vilnius, Lietuva)
<b>Darbo patirtis</b>	Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyrius
2010-2013	Laborantas
2013-2017	Biologas-tyrėjas
2017-dabar	Jaunesnysis mokslo darbuotojas

## **PADĖKA**

Esu nuoširdžiai dėkingas savo darbo vadovui dr. Mindaugui Zaremba už įdomias mokslines diskusijas, patarimus ir pagalbą ruošiant straipsnius ir šią disertaciją.

Taip pat noriu padėkoti prof. Virginijai Šikšniui už galimybę dirbti Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriuje, vertingas diskusijas bei pagalbą organizuojant įvairias vidines ir išorines veiklas.

Esu dėkingas visam Baltymų-nukleorūgščių sąveikos tyrimų skyriaus kolektyvui už paramą, pastabas ir sukurtą gerą atmosferą, ypač dr. Giedriui Sasnauskui už patarimus ir pagalbą su fluorescencijos anizotropijos eksperimentais.

Esu labai dėkingas žmonėms, kurie prisidėjo prie darbų, pateiktų šioje disertacijoje: dr. Arūnui Šilanskui už baltymų gryninimą ir gelfiltracijos eksperimentus, dr. Giedrei Tamulaitienei už H.CgII baltymo C-galinio domeno kristalinę struktūrą, dr. Česlovui Venclovui už struktūrinius palyginimus ir modeliavimą, dr. Elenai Manakovai už SAXS eksperimentus bei Rokui Grigaičiui už sukonstruotas plazmides su H.CgII baltymo domenais ir DNR susirišimo eksperimentus su R.CgII-B3 domenu.

Noriu padėkoti Audrai Rukšėnaitei (Biotechnologijos institutas) už atliktus masių spektrometrijos eksperimentus.

Aš taip pat noriu padėkoti Mark D. Szczelkun (Bristolio Universitetas, Bristolis, Jungtinė Karalystė) už neįkainojamas diskusijas, pastabas ir pagalbą rengiant mokslinius straipsnius.

Esu dėkingas savo chemijos mokytojai Albinai Regelskienei už nepaprastai įdomias chemijos pamokas ir supažindinimą su laboratorinių darbų grožiu.

Labiausiai esu dėkingas savo žmonai Monikai ir sūnui Matui bei savo tėvams ir draugams už supratimą, kantrybę bei palaikymą.

### **Finansinė parama:**

Disertacijoje aprašyti darbai buvo finansuoti Lietuvos Mokslo Tarybos (MIP-029/2011, MIP-56/2015). Stipendijas už mokslinius pasiekimus skyrė Lietuvos Mokslo Taryba.

## SUMMARY

Restriction-modification (RM) systems protect host bacterial and archaeal cells against invasion by foreign DNA (e.g. phage or plasmid DNA) (Pingoud *ir kt.*, 2014). They are classified into four types: Type I, II, III or IV, which differ in subunit composition, mechanism of action and cofactor requirement (Roberts *ir kt.*, 2003). Type II restriction enzymes are composed of two principal enzymatic activities: a restriction endonuclease and a DNA methyltransferase. They recognise short, usually palindromic sequences of 4-8 bp and cleave DNA at fixed positions within or close to their recognition site. A principal difference between Type II RM systems and other types is that Type II RM enzymes usually do not require adenosine triphosphate (ATP) for DNA cleavage (Pingoud *ir kt.*, 2014).

Originally, the restriction-modification system CgII from *Corynebacterium glutamicum* was assigned as Type II RM system (REBASE, <http://rebase.neb.com>) (Roberts *ir kt.*, 2015). However, CgII is organized of three genes: a methyltransferase (M.CgII), a putative phospholipase D superfamily endonuclease (R.CgII) and a predicted SF2 superfamily helicase/ATPase (H.CgII). Bioinformatic analysis showed that the putative restriction endonuclease (R.CgII) possesses a HxK nuclease active site motifs characteristic to well-studied Type IIS restriction endonuclease BfiI (Grazulis *ir kt.*, 2005). However, in contrast to BfiI, it shows no DNA cleavage activity. It was speculated that H.CgII subunit is required for DNA cleavage by the R.CgII subunit. *In silico* amino acid sequence analysis predicted that H.CgII is composed of three domains: an N-terminal SF2 superfamily helicase/ATPase domain (DEAD), a domain similar to the Z1 superfamily (Z1) and a distinct C-terminal domain. The Z1 domain is often found associated with SF2 helicase domain (Iyer *ir kt.*, 2008), which are also found in Type I, ISP and III enzymes that require ATP hydrolysis for DNA cleavage (Chand *ir kt.*, 2015; Gorbalenya *ir kt.*, 1991; McClelland *ir kt.*, 2004).

The main aim of this study was to establish structural and mechanistic details of the restriction-modification system CgII. In this work we provided biochemical characterization of the putative restriction endonuclease subunit R.CgII and putative ATPase subunit H.CgII, which together form a heterotetrameric restriction endonuclease  $R_2H_2$ .CgII complex. We demonstrated that R.CgII subunit cuts dsDNA at non-methylated CgII sites (5'-GCCGC-3') N6 and N6-7 downstream of top and bottom strand, respectively in the presence of catalytically active H.CgII subunit. Furthermore, we showed that H.CgII is an ATPase, which requires R.CgII subunit and long fragment of dsDNA with non-methylated CgII sites for optimal catalytic activity. We further scrutinized H.CgII subunit and revealed for the first time that it contains previously not described monomeric helicase-like DEAD-Z1 motor, responsible for the ATP binding/hydrolysis and DNA translocation. We solved the structure of C-terminal domain of H.CgII and revealed that it has a unique fold and is required for full activity of the  $R_2H_2$ .CgII complex. We demonstrated that the restriction endonuclease CgII uses bidirectional translocation mechanism to cut dsDNA in ATP dependent manner. Last but not least, we showed that the translocation activity may be transferred onto a non-specific DNA, but with lower efficiency, which is unusual among restriction enzymes. Summarising our results, we proposed a possible mechanism of action of the  $R_2H_2$ .CgII, which differs from all other characterized ATP-dependent RM enzymes.



## LITERATŪROS SARAŠAS

1. Afonine, P. V. ir kt. (2012). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, doi:10.1107/S0907444912001308.
2. Baker, N. A. ir kt. (2001). *P Natl Acad Sci USA*, doi:10.1073/pnas.181342398.
3. Bhattacharyya, B. ir kt. (2014a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1318001111.
4. Byrd, A. K. ir kt. (2012). *Front Biosci (Landmark Ed)*.
5. CCP4 (1994). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, doi:10.1107/S0907444994003112.
6. Chand, M. K. ir kt. (2015). *Nat Chem Biol*, doi:10.1038/nchembio.1926.
7. Cheng, Z. H. ir kt. (2005). *Rna*, doi:10.1261/rna.2920905.
8. Cordin, O. ir kt. (2006). *Gene*, doi:10.1016/j.gene.2005.10.019.
9. Crooks, G. E. ir kt. (2004). *Genome Res*, doi:10.1101/gr.849004.
10. Dolinsky, T. J. ir kt. (2004). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkh381.
11. Durr, H. ir kt. (2005). *Cell*, doi:10.1016/j.cell.2005.03.026.
12. Embleton, M. L. ir kt. (2001). *J Mol Biol*, doi:10.1006/jmbi.2001.4892.
13. Emsley, P. ir kt. (2004). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, doi:10.1107/S0907444904019158.
14. Fairman-Williams, M. E. ir kt. (2010). *Curr Opin Struct Biol*, doi:10.1016/j.sbi.2010.03.011.
15. Firman, K. ir kt. (2000). *Embo J*, doi:10.1093/emboj/19.9.2094.
16. Frick, D. N. ir kt. (2007). *J Mol Biol*, doi:10.1016/j.jmb.2006.10.023.
17. Gasiunas, G. ir kt. (2008). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkm1090.
18. Gorbalenya, A. E. ir kt. (1991). *FEBS Lett*.
19. Grazulis, S. ir kt. (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.0507949102.
20. Hao, Q. (2004). *J Appl Crystallogr*, doi:10.1107/S0021889804008696.
21. Iyer, L. M. ir kt. (2008). *Biology Direct*, doi:10.1186/1745-6150-3-8.
22. Yoshioka, K. (2002). *Comp Stat*, doi:10.1007/s001800200117.
23. Kabsch, W. (2010). *Acta Crystallogr D*, doi:10.1107/S0907444909047337.
24. Krissinel, E. ir kt. (2007). *J Mol Biol*, doi:10.1016/j.jmb.2007.05.022.
25. Lagunavicius, A. ir kt. (2003). *J Mol Biol*, doi:10.1016/S0022-2836(03)00020-2.
26. Landry, D. ir kt. (1992). *Methods Enzymol*, doi:10.1016/0076-6879(92)16025-F.
27. Lemaire, P. A. ir kt. (2006). *Biochemistry*, doi:10.1021/bi060567d.
28. Loenen, W. A. ir kt. (2014b). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkt847.
29. Loenen, W. A. ir kt. (2014a). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkt747.
30. McClelland, S. E. ir kt. (2004). The Type I and III Restriction Endonucleases: Structural Elements in Molecular Motors that Process DNA. In: Pingoud A.M. (eds) *Restriction Endonucleases*, Springer.
31. Morris, R. J. ir kt. (2004). *J Synchrotron Radiat*, doi:10.1107/S090904950302394x.
32. Murray, N. E. (2000). *Microbiol Mol Biol R*, doi:10.1128/Mmbr.64.2.412-434.2000.
33. Olechnovic, K. ir kt. (2017). *Proteins*, doi:10.1002/prot.25278.
34. Painter, J. ir kt. (2006). *J. Appl. Cryst.*, doi:10.1107/S0021889805038987.
35. Panjikar, S. ir kt. (2005). *Acta Crystallogr D*, doi:10.1107/S0907444905001307.
36. Peakman, L. J. ir kt. (2004). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkh762.
37. Pingoud, A. ir kt. (2001). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/29.18.3705.
38. Pingoud, A. ir kt. (2014). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gku447.
39. Rao, D. N. ir kt. (2014). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkt616.
40. Roberts, R. J. ir kt. (2003). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkg274.
41. Roberts, R. J. ir kt. (2015). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gku1046.

42. Roy, A. ir kt. (2010). *Nat Protoc*, doi:10.1038/nprot.2010.5.
43. Sali, A. ir kt. (1993). *J Mol Biol*, doi:10.1006/jmbi.1993.1626.
44. Sambrook, J. ir kt. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
45. Sapranaukas, R. ir kt. (2000). *J Biol Chem*, doi:10.1074/jbc.M003350200.
46. Schafer, A. ir kt. (1997). *Gene*, doi:10.1016/S0378-1119(97)00519-2.
47. Schneider, T. R. ir kt. (2002). *Acta Crystallogr D*, doi:10.1107/S0907444902011678.
48. Schrödinger, L. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre.
49. Seidel, R. ir kt. (2008). *Embo J*, doi:10.1038/emboj.2008.69.
50. Seidel, R. ir kt. (2005). *Embo J*, doi:10.1038/sj.emboj.7600881.
51. Sheldrick, G. M. ir kt. (2001). *Nato Sci Ser I Life*.
52. Singleton, M. R. ir kt. (2007). *Annu Rev Biochem*, doi:10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300.
53. Sinkunas, T. ir kt. (2011). *Embo J*, doi:10.1038/emboj.2011.41.
54. Sisakova, E. ir kt. (2013). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gks1209.
55. Stanley, L. K. ir kt. (2006). *Embo J*, doi:10.1038/sj.emboj.7601104.
56. Szczelkun, M. D. (2013). *Adv Exp Med Biol*, doi:10.1007/978-1-4614-5037-5\_11.
57. Szczelkun, M. D. ir kt. (1996b). *EMBO J*.
58. Szczelkun, M. D. ir kt. (1996a). *Embo J*.
59. Szczelkun, M. D. ir kt. (1997). *J Mol Biol*, doi:10.1006/jmbi.1997.1172.
60. Tamulaitiene, G. ir kt. (2014). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gku1237.
61. Toliusis, P. ir kt. (2018). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gky107.
62. Toliusis, P. ir kt. (2017). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkx580.
63. Toseland, C. P. ir kt. (2012). *PLoS One*, doi:10.1371/journal.pone.0038270.
64. Toth, J. ir kt. (2015). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkv1154.
65. van Aelst, K. ir kt. (2015). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkv1129.
66. van Aelst, K. ir kt. (2013). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gks1210.
67. van Aelst, K. ir kt. (2010). *Proc Natl Acad Sci U S A*, doi:10.1073/pnas.1001637107.
68. Vitkute, J. ir kt. (1998). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/26.14.3348.
69. Wood, K. M. ir kt. (2005). *J Mol Biol*, doi:10.1016/j.jmb.2005.04.053.
70. Xu, S. Y. ir kt. (2012). *J Bacteriol*, doi:10.1128/JB.06248-11.
71. Zaremba, M. ir kt. (2010). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gkq560.
72. Zaremba, M. ir kt. (2014). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gku1236.
73. Zhang, J. ir kt. (2011). *Structure*, doi:10.1016/j.str.2011.09.022.
74. Zheng, L. ir kt. (2004). *Nucleic Acids Res*, doi:10.1093/nar/gnh110.