

# Pavienių molekulių fluorescencinė ir FRET mikroskopija DNR ir baltymų sąveikos tyrimams

## Single-molecule fluorescence and FRET microscopy for DNA - protein interaction studies

Marijonas Tutkus<sup>1</sup>, Giedrė Karzaitė<sup>1</sup>, Šarūnė Ivanovaitė<sup>1</sup>, Tomas Marčiulionis<sup>1</sup>, Danielis Rutkauskas<sup>1</sup>, Mindaugas Zaremba<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Vilniaus universitetas, Biotechnologijos Institutas, Saulėtekio al. 7, 10257 Vilnius

<sup>2</sup>Fizinių ir technologijos mokslų centras, Savanorių pr. 231, 02300 Vilnius

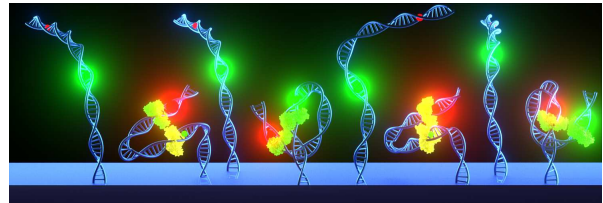
[marijonas.tutkus@ftmc.lt](mailto:marijonas.tutkus@ftmc.lt)

Per daugiau nei 20 metų, nuo pirmųjų pritaikymų biofizikiniuose tyrimuose, pavienių molekulių (PM) fluorescencijos metodai subrendo ir išsiplėtojo leisdami atsakyti į daugelį biologinių klausimų, į kuriuos atsakymų nebuvo rasta naudojant ansamblio tipo matavimo metodus. Šiuo metu PM fluorescencijos metodai naudojant Fiersterio rezonansinę energijos pernašą (FRET) ir kitus principus leidžia stebėti dinamines nukleorūgščių ir baltymų sąveikas, tirti konformacinę baltymų dinamiką, sekėti individualių biomolekulių ir kitų nanometrinių dydžių biologinių kompleksų judėjimą mikroniniais atstumais ir atskleisti sukamuosius kompleksinių sistemų judesius [1]. Šiuo metu vykstant perėjimui iš *in vitro* į *in vivo* ir *in situ* sąlygas, yra tikimasi kad PM fluorescencijos ir FRET metodai taps plačiai naudojami įrankiu molekulinėje biologijoje [2]. Pranešimo metu aptarsiu PM fluorescencinės mikroskopijos metodus, reikalavimus keliamus šioms matavimams, bei technologinius proveržius ir išskylančias problemas.

Taip pat pranešimo metu pristatysiu mūsų laboratorijoje atliekamus PM fluorescencinės mikroskopijos tyrimus, kurie šiuo metu fokusuojasi į mechanistinį Restrikcijos endonukleazės (REazės) ir DNR sąveikų išaiškinimą. REazės saugo bakterijas nuo neigiamo virusinės DNR poveikio. Antrojo tipo REazės atpažįsta 4 - 8 bazių porų ilgio taikinius esančius virusinėje DNR ir juos perkerpa pusiau. Tokiu būdu virusinė DNR yra inaktyvuojama. Daugelis II-ojo tipo REazių vykdo efektyvų DNR karpymą tik prisijungusios prie dviejų DNR taikinių [4]. Vienu metu vykstanti tokio tipo edonukleazės sąveika su dviem DNR taikiniams galiausiai suformuoja DNR kilpą (1 pav.). Pristatysiu mūsų išvystytą PM FRET mikroskopijos metodiką DNR ir baltymo sąveikos tyrimams [5, 3]. Ji leido atlikti kiekybinius Ecl18kI REazės ir ant paviršiaus imobilizuotų DNR molekulių dinaminės sąveikos tyrimus. Taip pat pristatysiu naujus BfI (BfI K107A ir BfI-SS) ir DNR sąveikos PM FRET mikroskopijos tyrimų rezultatus.

Pavienių molekulių FRET matavimams pritaikėme gerai veikiančią strategiją: biotinilintas ir FRET dažiklių pora pažymėtas DNR molekules imobilizavome ant silanizuoto ir metoksi-PEG bei biotin-PEG modifikuoto dengiamojo stiklelio per neutravidiną. Susiformavus DNR kilpai dažikliai esantys prie REazės taikinių suartėja ir donoro fluorescencijos energija rezonansiniu būdu yra pernešama į akceptorius (1 pav.). Pernašos efektyvumas priklauso nuo atstumo tarp šių dažiklių. Šis metodas leidžia matuoti atstumą tarp dažiklių nuo 2 iki 10 nanometrų. Mes parodėme, kad du ant DNR prisijungę Ecl18kI di-

merai formuoja tetramerą ir kilpoja DNR tokiu greičiu, kuris yra keliomis eilėmis lėtesnis nei difuzijos greitis. Taip pat mūsų išvystyta matavimo metodika leido atskirti ir charakterizuoti dviejų tipų DNR kilpas. Mūsų atlikti BfI tyrimai parodė, kad vienas dimeras prisijungia du taikinius esančius ant vienos DNR molekulės ir taip suformuoja vieno tipo DNR kilpą. BfI aktyvaus centro mutantas (K107A) parodė skirtingą dinaminę sąveiką su DNR, nei užrakintas BfI-SS baltymas.



1 pav. Tetramerinės REazės Ecl18kI indukuoto DNR kilpojimo tyrimų naudojant PM fluorescencinės mikroskopijos ir FRET schema. FRET dažiklių pora žymėtas, du Ecl18kI prisijungimo taikinius turintis biotinilintas DNR fragmentas per Neutravidiną yra prijungiamas prie metoxy-PEG ir Biotin-PEG mišiniu padengto stiklelio. Prie kiekvieno iš taikinių prisijungia po Ecl18kI dimerą, kurie tarpusavyje sąveikaudami suformuoja DNR kilpą. Ecl18kI atpažįsta palindrominę taikinio seką, todėl DNR kilpa gali susiformuoti dviejų tipų (U formos ir phi formos). Mūsų išvystytas PM fluorescencinės mikroskopijos tyrimo metodas leido realiu laiku stebėti kiekvienos iš šių kilpų dinamiką [5].

*Reikšminiai žodžiai: FRET, pavienės molekulės, DNR baltymo sąveika, Restrikcijos endonukleazės*

### Literatūra

- [1] C. Joo, H. Balci, Y. Ishitsuka, C. Buranachai, and T. Ha, *Annu. Rev. Biochem* 77: 51-76 (2008).
- [2] M. Sustarsic and A. N. Kapanidis, *Curr Opin Struct Biol*. 34: 52-9 (2015).
- [3] D. Rutkauskas, M. Petkelyte, P. Naujalis, G. Sasnauskas, G. Tamulaitis, M. Zaremba, and V. Siksny, *J Phys Chem B*. 118(29): 8575-82 (2014).
- [4] M. Zaremba, and V. Siksny, *Biochemistry* 54(34): 5340-7 (2015).
- [5] M. Tutkus, T. Marciulionis, G. Sasnauskas, and D. Rutkauskas, *Biophys J*. 112(5): 850-858 (2017).