

NgoMIV endonuklezės sąveikos su DNR dinamikos tyrimas panaudojant pavienių molekulių FRET

Probing the Dynamics of Restriction Endonuclease NgoMIV-DNA Interaction by Single-Molecule FRET

Marijonas Tutkus¹, Giedrius Sasnauskas², Danielis Rutkauskas¹

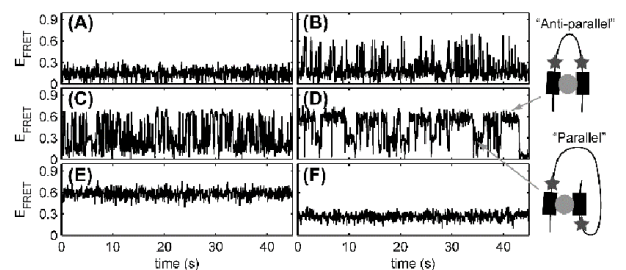
¹Fizinių ir technologijos mokslų centras, Savanorių pr. 231, 02300 Vilnius

²Biotechnologijos institutas, Vilniaus universitetas, Saulėtekio al. 7, LT-10257 Vilnius

danielis@ar.fi.lt

Restrikcijos endonuklezės (REazės) yra esminės restrikcijos-modifikacijos sistemų komponentės, apsaugančios bakterijas nuo bakteriofagų infekcijos. Geriausiai žinomos yra II tipo REazės, naudojamos kaip molekulinės žirklys įvairioms *in vitro* manipuliacijoms. Jos atpažįsta 4-8 bazių porų DNR taikinius ir ties jais kerpa abi DNR grandines. Įprastai, šiai reakcijai pakanka Mg^{2+} jonų kofaktoriaus. Nepaisant panašios funkcijos, II tipo REazės skiriasi oligomerine struktūra ir DNR karpymo mechanizmu. Ortodoksinės II tipo REazės yra homodimerai, sąveikaujantys su ir kerpantys pavienius DNR taikinius. Tuo tarpu, IIF tipo REazėms efektyviam karpymui būtina sąveika su dviem taikiniams tuo pačiu metu. Tokios sąveikos rezultatas yra DNR kilpojimas, stebimas taip pat ir kituose biologiniuose procesuose—genų ekspresijos reguliacijoje, DNR replikacijoje ir rekombinacijoje. Dėl to, kad yra santykinai paprastos, REazės yra patogios modelinės sistemos kilpojimosi procesui tirti. Taigi, šio darbo tema buvo kiekybinis DNR sąveikos charakterizavimas su homotetramerine REaze-NgoMIV, sąveikaujanti su dviem simetriškais 5'-GCCGGC-3' DNR taikiniams. NgoMIV indukuotas DNR kilpojimas buvo bandomas tirti anksčiau biocheminiais metodais,[1] bet DNR kilpos pasirodė esančios pernelyg nestabilios. Taip pat, panaudojant pavienių molekulių fluorescencijos koreliacijos spektroskopiją buvo rastos NgoMIV-DNR kompleksų difuzijos charakteristikos.[2] Šiame darbe mes tyrėme NgoMIV sąveikos su ant paviršiaus imobilizuotais DNR fragmentais dinamiką realiu laiku, panaudodami pavienių molekulių Förster'io rezonansinės energijos pernašos (FRET) ir visiško vidaus atspindžio fluorescencijos (TIRF) mikroskopijos metodą. DNR fragmentai buvo pažymėti fluorescentiniais dažikliais arti NgoMIV atpažinimo sekų taip, kad DNR taikiniams suartėjus dėl sąveikos su REaze, atstumas tarp dažiklių tampa tinkamas efektyviai FRET. Tokiu būdu, FRET efektyvumo kitimas yra tiesiogiai susijęs su DNR sąveikos su NgoMIV dinamika. Papildomai FRET, naudotai stebėti NgoMIV indukuojamam DNR kilpojimuisi, taip pat buvo panaudotas baltymo indukuotas fluorescencijos sustiprinimo efektas (PIFE) charakterizuoti NgoMIV-DNR kompleksų disociacijai. Kombinuojant šias dvi metodikas buvo gautos DNR išsikilpojimo ir NgoMIV disociacijos kinetinės konstantos. Buvo gauta, kad NgoMIV disociuoja nuo pavienio DNR taikinio palyginti lėtai—vidutiniškai per

~5 min. Tuo tarpu, NgoMIV sąveika su dviem DNR taikiniams pasirodė esanti heterogeniška, demonstruojanti labai skirtingus DNR kilpos stabilumus (1 pav.).



1 pav. Skirtingos individualių DNR fragmentų FRET efektyvumo laikinės priklausomybės.

Stebėtas sąveikos nevienalytiškumas iš dalies buvo paašškintas tuo, kad NgoMIV, būdamas tetramerinis baltymas, formuoja skirtingo pavidalo—specifines arba pusiau specifines kilpas, kuomet sąveikauja su dviem specifiniais arba vienu specifiniu ir vienu nespecifiniu DNR taikiniu, atitinkamai. Kita vertus, sąveikos įvairialypiškas taip pat buvo susietas su galimu NgoMIV fermento konformaciniu heterogenišku.

Reikšminiai žodžiai: DNR kilpojimas, kinetinė greičio konstanta, heterogeniškas.

Literatūra

- [1] S. E. Milsom, S. E. Halford, M. L. Embleton, M. D. Szczelkun, *J Mol Biol* **2001**, *311*, 515.
- [2] Z. Katiliene, E. Katilius, N. W. Woodbury, *Biophys J* **2003**, *84*, 4053.