

Форма 503. РАЗВЕРНУТЫЙ НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ

3.1. Номер Проекта

16-04-00575

3.2. Название Проекта

Инициация репарации «мисматчей» белком MutL из альфа-протеобактерии *Rhodobacter sphaeroides*: факторы, определяющие гидролиз и дискриминацию цепей ДНК

3.3. Коды классификатора, соответствующие содержанию фактически проделанной работы

04-220

3.4. Объявленные ранее цели Проекта

1. Оптимизация процесса выделения стабильного рекомбинантного белка MutL из *Rhodobacter sphaeroides* (rsMutL).
2. Выделение белков MutS (rsMutS) и бета-«зажима» из *R. sphaeroides*, проверка их активности.
3. Конструирование кольцевых ДНК, с и без G/T-пары, и плазмид, с микросателлитными локусами, представленными разным числом повторов.
4. Оценка влияния на эндонуклеазную функцию rsMutL ионов цинка.
5. Получение плазмидных конструкций, несущих гены мутантных форм rsMutS и rsMutL.
6. Получение модифицированных ДНК-субстратов для селективного кросслинкинга белков rsMutS и rsMutL, а также линейных ДНК, в том числе с флуоресцентной меткой.
7. Подбор концентраций MutL и ДНК, требуемых для изучения их взаимодействия методом «остановленной струи».
8. Анализ кривых роста клеточных культур *R. sphaeroides* в различных условиях.

3.5. Полученные в ходе выполнения Проекта важнейшие результаты

Белки MutL, MutS и бета-субъединица ДНК-полимеразы III (бета-«зажим») – компоненты системы репарации некоплементарных пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) из *Rhodobacter sphaeroides* впервые были выделены нами в рамках выполнения проекта № 13-04-00615_а. Белки rsMutS и бета-«зажим» высокой степени очистки получены в количестве нескольких миллиграмм. rsMutL, содержащий блок из 6 остатков His на N-конце молекулы (рис. 1А), в ходе выделения подвергался значительному действию протеаз, гидролизующих белок в районе подвижного линкера между N- и C-концевыми доменами. Эффективность выделения этого белка методом хроматографии на Ni-NTA-агарозе была невысока. rsMutL оказался плохо растворим и большая его часть обнаруживалась в осадке. Для улучшения связывания белка из клеточного лизата с Ni-NTA агарозой (в дополнении к имеющейся плазмидной конструкции (рис. 1А)) были созданы две другие системы. В одной из них блок из 6 остатков His находился на C-конце молекулы (1Б), в другой – His₆-блок был отделен от N-конца rsMutL 20 дополнительными аминокислотными остатками (рис. 1В). Однако изменение положения гистидиновой вставки не оказало заметного влияния на выход белка. Плохая растворимость белка может быть связана со слишком большим его количеством или неправильным сворачиванием глобулы в процессе экспрессии. Использование штамма BL21(DE3)pLysS позволило уменьшить скорость синтеза и количество rsMutL в клетке и увеличить его растворимость. Также было уменьшено количество добавляемого изопротил-1-бета-D-тиогалактопиранозида (до 100 мкМ) и снижена температура индукции до 18 градусов. В настоящее время проводится

выделение rsMutL из клеточных лизатов, полученных в различных условиях. Исследуется влияние pH, концентрации NaCl, наличия поверхностно-активных веществ (NP-40 и Tween 20) в буферах для выделения на растворимость белка.

На данном этапе получены небольшие количества rsMutL. Активность этого белка тестировали по его способности вносить одноцепочечный разрыв в специально сконструированную плазмиду, содержащую «мисматч» G/T. Наиболее эффективно фермент гидролизует плазмидную ДНК в присутствии ионов Mn^{2+} . Показано, что гомологи rsMutL способны связывать ионы цинка (Pillon et al., 2010, Mol. Cell, 39, 145). Мы установили, что ионы Zn^{2+} (5 мМ) практически не стимулируют эндонуклеазную функцию rsMutL, но совместное присутствие ионов Mn^{2+} и Zn^{2+} увеличивает количество плазмиды с одноцепочечным разрывом, а также её линейной формы по сравнению с гидролизом в присутствии только ионов Mn^{2+} , что согласуется с данными, полученными для MutL из *Bacillus subtilis*. Наши результаты подтверждают предположение о структурной функции иона цинка, координация которого обеспечивает устойчивую ориентацию между субдоменами белка (Pillon et al., 2010, Mol. Cell, 39, 145; Kosinski et al., 2008, J. Mol. Biol., 382, 610).

Активность выделенного rsMutS проверяли по его способности связывать ДНК, содержащую «мисматч» (см. раздел 3.7.1). Оценена константа диссоциации этого белка с 41-звенным ДНК-дуплексом, которая составила около 40 нМ. Для проверки активности бета-«зажима» предполагалось использовать подход, основанный на регистрации флуоресценции красителя SYTOX Blue. SYTOX Blue, не специфически связанный с двуцепочечной ДНК, является донором флуоресценции в паре с акцептором Alexa-594, локализованным в белке. Проведена модификация единственного Cys191, имеющегося в составе бета-«зажима», производным Alexa-594, содержащим малеимидную группу. Однако выходы модифицированного белка не превышали 10%, что оказалось недостаточным для эффективной регистрации флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). В дальнейшем тестирование активности бета-«зажима» будет основано на наблюдении, сделанном для родственного белка - эукариотического фактора процессивности PCNA, который стимулирует способность MutL эукариот гидролизовать линейную ДНК (Pluciennik et al., 2010, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 16066).

Для выяснения влияния одноцепочечных разрывов в ДНК, полученной в результате гибридизации нескольких олигонуклеотидов, на специфичность её гидролиза эндонуклеазой rsMutL сконструированы 200-звенные линейные дуплексы с G/T-парой, содержащие единичный разрыв в определенной позиции «нижней» или «верхней» цепи субстрата по разные стороны от «мисматча». Для анализа продуктов гидролиза таких ДНК rsMutL в присутствии MutS и бета-«зажима» методом Максама-Гилберта на 5'-концы всех фрагментов ДНК, входящих в состав дуплекса, введена флуоресцентная метка.

Недавно появились отдельные доказательства непосредственного связывания MutL из *E. coli* (ecMutL) с одно- и двуцепочечной ДНК. В работе (Groothuizen et al., 2015, eLife 2015, 4, e06744) показано, что связывание ecMutL с 41-звенным ДНК-дуплексом, содержащим флуорофор TAMRA на 5'-конце, приводит к повышению анизотропии флуоресценции. Это наблюдение дало нам основание для изучения методом «остановленной струи» (stopped flow) кинетики связывания белка ecMutL, который может быть выделен из клеток-продуцентов в достаточном количестве, с 30-звенной ДНК, содержащей молекулу TAMRA, ковалентно присоединенную к 5'-концу одной из цепей ДНК-дуплекса. В предварительных экспериментах выяснено, что связывание ecMutL с ДНК происходит в течение первых нескольких секунд взаимодействия. Однако изменения анизотропии и интенсивности флуоресценции TAMRA имели небольшую амплитуду, что может свидетельствовать как об образовании

нестабильного белково-нуклеинового комплекса, так и о неоптимальном расположении красителя для регистрации протекающих процессов. При выборе концентраций биомолекул мы исходили из полученных нами результатов для других ДНК-связывающих белков – НЭ BspD6I, ДНК-метилтрансферазы SsoII, AP-эндонуклеазы человека APE1, ДНК-гликозилаз Fpg, hOGG1, и использовали в экспериментах 200 нМ есMutL и 100 нМ ДНК. На следующих этапах работы при использовании более высоких концентраций белка и ДНК-дуплексов различной длины и варьировании положения флуорофора будут получены достоверные кинетические кривые, характеризующие стадию связывания.

Для детального анализа кинетики взаимодействия белков с эндонуклеазной функцией с ДНК-дуплексами мы также предложили использовать метод акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре. Учитывая, что и этот метод требует высоких концентраций препаратов (до 1 мкМ), мы отработали условия проведения эксперимента на структурном и функциональном аналоге rsMutL - никующей эндонуклеазе (НЭ) BspD6I.

Для ковалентной фиксации динамически подвижных и функционирующих в форме «скользящих зажимов» белков MutS и MutL на ДНК использованы 17- и 47-звенные дуплексы, содержащие в 5-ом положении дезоксиуридина триазо-4-гексин-5-1N-пропил-N-акриламидный заместитель (рис. 2). На модельном белке есMutS(N497C), содержащем единственный остаток цистеина, продемонстрировано, что акриламидная группа может эффективно и селективно реагировать с SH-группами Cys (выход конъюгата 20%). Установлено, что эта реакция характеризуется высокой специфичностью, поскольку есMutS(N497C) взаимодействует только с дуплексом, содержащим dU с реакционноспособной группой на расстоянии 4 нуклеотидов с 5'-стороны от некомплементарной G/T-пары. Ранее нами было показано, что этот белок и другие его одноцистеиновые мутантные формы менее избирательно взаимодействуют с ДНК, несущими пиридилдисульфидную группировку. К сожалению, белок есMutL и его мутантные формы не реагируют с акриламидсодержащими ДНК, что скорее всего связано с недостаточной реакционной способностью модифицированной ДНК для фиксации MutL в составе менее стабильного белково-нуклеинового комплекса. Поэтому для получения конъюгатов есMutL и rsMutL мы вернулись к использованию ДНК с пиридилдисульфидной группировкой. Были синтезированы протяженные фрагменты ДНК с аминогруппой на гексаметиленовом линкере в 5-ом положении одного из остатков Т. Эта аминогруппа затем подвергалась модификации N-гидроксисукцинимид-3-(2-пиридилдитио)пропионатом или N-гидроксисукцинимид-2-пиридилдитио-тетраоксотетрадеканом.

Образование ДНК-белковых конъюгатов в ходе селективного кросслинкинга между остатками Cys белка и ДНК-лигандами, содержащими пиридилдисульфидную группу, позволит сделать вывод о сближенности rsMutL и ДНК. С этой целью нами получены плазмидные конструкции, несущие гены мутантных форм N-концевого (ДНК-связывающего) домена rsMutL, содержащих единственный остаток Cys в позициях 233, 265, 295 (A233C, G263C, S295C). Имеющиеся в N-концевой части исходного белка остатки C60, C73, C308 находятся вне ДНК-связывающего центра и были заменены на Ser. Выбор аминокислотных остатков для мутагенеза основывался на наших предшествующих данных по ковалентной фиксации есMutL (см. проект № 13-04-00615_a) на ДНК и результатах прецизионного сравнения аминокислотных последовательностей, выполненных для есMutL, rsMutL и их гомологов, найденных в базе данных UniProt. Также получена плазида с геном мутантной формы rsMutS, содержащей единственный остаток цистеина в позиции G504. Эта позиция выбрана по аналогии с позицией N497 в есMutS. Белок есMutS(N497C) очень эффективно

взаимодействовал с реакционноспособными ДНК, имеющими в своем составе пиридилдисульфидную группу.

В данной работе мы впервые начали изучать влияние тринуклеотидных повторов на реализацию эндонуклеазной функции MutL бактерий. В случае тринуклеотидного повтора (GGT/ACC)_n его G-богатая цепь может складываться во внутримолекулярный G-квадруплекс (Оглоблина и др., 2015, Биохимия, 80, 8, 1224). На первом этапе была получена плаزمида, содержащая 12 повторов GGT/ACC. Показано, что наличие этих повторов не влияет на функционирование rsMutL. Следующим этапом будет анализ гидролиза уже имеющейся плазмиды с 20 повторами GGT/ACC. Это максимальное количество повторов, которое можно получить при прямом химическом синтезе необходимой вставки в плазмиду. Также получена плазмидная конструкция с восьмью тетрануклеотидными повторами GGGT, которые однозначно формируют квадруплексную структуру (Долинная и др., 2016, Успехи биол. химии, 56, 53). На этих примерах будет продолжено изучение rsMutL-индуцированного гидролиза повторяющихся генетически нестабильных последовательностей.

В системе MMR *E. coli* функцию первоначального гидролиза дефектной дочерней цепи выполняет эндонуклеаза MutH, которая является аналогом эндонуклеазного домена MutL из других бактерий. Мы решили выяснить, влияет ли наличие G-квадруплекса в ДНК на функционирование этого фермента. Прямым олигонуклеотидным синтезом были получены флуоресцентно меченные 95- и 76-звенные компоненты для формирования дуплексов, содержащих участок расщепления MutH, вставку квадруплексного или неструктурированного мотива в дочерней цепи и G/T-пару. Установлено, что ни G-квадруплексная структура, ни дополнительная неструктурированная петля не ингибируют расщепление ДНК эндонуклеазой (рис. 3). В следующем году будет реконструирована система инициации репарации и выяснен вопрос, как квадруплекс влияет на узнавание G/T-пары комплексом MutS-MutL и активацию эндонуклеазы MutH.

В проекте планируется оценить активность rsMutS и rsMutL в клеточных экстрактах *R. sphaeroides*, полученных из культур, выращенных в различных условиях. На первом этапе мы исследовали рост культур клеток *R. sphaeroides* в микроаэробных, аэробных, фототрофных и анаэробных условиях, отличающихся уровнем аэрации и наличием/отсутствием света. Кривые роста клеток, выращенных в микроаэробных и аэробных условиях (в темноте, но с различным уровнем аэрации) практически совпадают. В фототрофных условиях (в отсутствие кислорода на свету) клетки растут заметно медленнее, но достигают большей оптической плотности. В анаэробных условиях (в отсутствие кислорода и в темноте) рост клеток практически не наблюдается (рис. 4). Для дальнейших экспериментов нами выбраны микроаэробные условия.

3.6. Сопоставление полученных результатов с мировым уровнем

Полученные за отчетный период результаты соответствуют мировому уровню.

Изучение кинетики связывания белков системы MMR и конформационных перестроек внутри отдельных компонентов комплекса в настоящее время ограничивается только белком MutS и его гомологами, узнающими «мисматч» (Huang, Crothers, 2008, J. Mol. Biol., 384, 31; Biro et al., 2010, J. Vis. Exp., 37, 1). Для облегчения экспериментальной работы и упрощения интерпретации результатов часто используют делеционные мутанты многодоменных белков. Однако эта стратегия неприменима в случае белка MutL, так как взаимодействие доменов внутри полноразмерного белка, по-видимому, влияет на его активность. Поэтому наши попытки по поиску условий для исследования кинетики взаимодействия с ДНК полноразмерных многодоменных белков, несомненно, соответствуют мировому уровню. Белковые комплексы, образующиеся в процессе

репарации, являются динамически подвижными и перемещаются по цепи ДНК, что затрудняет их изучение. Одним из способов исследования таких комплексов является ковалентная фиксация белков на ДНК. Помимо нашей группы этот метод исследования систем репарации активно используется в лаборатории проф. О.И. Лаврик (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Россия) и проф. П. Фридрихсхоффа (Университет имени Ю. Либиха, Германия).

Недавно стало известно, что белок MutS способен узнавать не только «мисматчи», но и неканонические конформации ДНК, такие как шпильки, G-квадруплексы и крестообразные структуры (структуры Холлидея) (Vasquez et al., 2013, *Mutat. Res.*, 118, 743). В литературе нет информации про взаимодействие G-квадруплексов с другими ключевыми белками системы репарации «мисматчей»: MutL и MutH. Такие исследования представляют особую важность, так как сбой в работе репарационных систем приводит к геномным перестройкам, ассоциированным с канцерогенезом, нейродегенеративными и др. заболеваниями.

Система MMR из *R. sphaeroides* ранее не изучалась. Все результаты получены нашей научной группой впервые.

3.7.1. Методы и подходы, использованные в ходе выполнения Проекта

Плазмиды, несущие гены белков rsMutL, rsMutS и бета-«зажима», были получены на основе плазмид pET15b, pET45, pQE6 pQE13, и любезно предоставлены науч. сотр. А.М. Лящуком (НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, г. Москва). Для генетических конструкций на основе вектора pET была использована линия клеток *E. coli* BL21(DE3), для pQE векторов использовалась линия M15. Выделение белков из лизата клеток проводилось методом металлохелатной аффинной хроматографии с последующей очисткой на колонке Superdex 200 (rsMutL, rsMutS) или гепарин-сефарозе (бета-«зажим»).

Поиск гомологов белка rsMutL (штамм *R. sphaeroides* 2.4.1) проводили по базе данных UniProt. Найденные аминокислотные последовательности (около 1000) были переведены в формат fasta и с помощью алгоритма mafft выполнено их «выравнивание». Затем удалили идентичные аминокислотные последовательности и вновь провели сравнение оставшихся последовательностей (около 400) в программе jalview с помощью алгоритма muscle. Домены rsMutL и участки связывания лигандов в белке были охарактеризованы с помощью ресурса <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/515707382?report=genpept>.

Для получения мутантных форм N-концевой области белка rsMutL методом ПЦР был синтезирован участок гена, кодирующий нужную часть белка, и клонирован в вектор pET15b по сайтам рестрикции BamHI и NdeI. Плазмидная конструкция после лигирования трансформировалась в клетки XL1-Blue *E. coli*. Из полученных колоний выделяли плазмидную ДНК; наличие и правильность вставки оценивали секвенированием. Остатки Cys, имеющиеся в диком типе белка, последовательно заменяли на Ser методом сайт-направленного мутагенеза. Ген белка без Cys использовали в качестве матрицы для встраивания единственного остатка Cys в заданное положение. Мутации в ген вводились по стандартной методике с использованием перекрывающихся в месте мутации праймеров. Аналогичным методом был получен ген мутантной формы белка rsMutS, содержащий единственный остаток Cys в положении 504.

Подбор концентраций esMutL и ДНК, требуемых для изучения их взаимодействия методом «остановленной струи» (stopped flow) выполняли в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (лаборатория исследования модификации биополимеров, руководитель проф. О.С. Федорова) на спектрометре фирмы «Applied Photophysics» (Великобритания) модели SX20. Регистрировали изменения анизотропии флуоресценции при взаимодействии esMutL с 30-звенным ДНК-

дуплексом, содержащим флуорофор TAMRA. Для математической обработки экспериментальных данных использовали программы нелинейной регрессии (DynaFit, Scientist, SigmaPlot, Origin). Ранее такие исследования для этого класса ферментов не проводились.

Для получения информации о кинетике процесса связывания НЭ BspD6I с ДНК использовали метод акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре. Эта часть работы проводилась в сотрудничестве с проф. Т. Гиаником (Университет имени Коменского, г. Братислава, Словакия). На первом этапе на золотом электроде кварцевой пластины проводили иммобилизацию нейтравидина. Затем добавляли 1 мкМ раствор ДНК-дуплекса, содержащего на 5'-конце «нижней» цепи биотин. К иммобилизованному на электроде дуплексу добавляли раствор НЭ BspD6I (0,05-1,0 мМ). Константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) рассчитывали согласно подходу, изложенному в работе (Tassew, Thompson, 2003, *Biophys. Chem.*, 106, 241-52).

Для синтеза реакционноспособных олигонуклеотидов был получен амидофосфит, содержащий акриламидную группу в 5-ом положении остатка dU. Исходным соединением был 5-иод-2'-дезоксинуридин (Asakura et al., 1988, *Tetrahedron Lett.* 29, 2855), по С5-атому которого присоединяли октан-1,7-диин (Gierlich et al., 2006, *Org. Lett.*, 17, 3639). Следующие стадии представляли собой введение диметокситритильной защиты на 5'-гидроксил нуклеозида и его фосфитилирование. Полученный модифицированный олигонуклеотид с терминальной этинильной группой вводили в реакцию с N-(3-азидопропил)акриламидом в присутствии солей меди (I). Целевое соединение выделяли с помощью гель-электрофореза, строение подтверждали методом масс-спектрометрии. 59-Звенные модифицированные ДНК, содержащие 3-(2-пиридилдитио)пропиламидную группу, синтезировали по схеме, описанной в заявке этого проекта и в нашей публикации (Monakhova et al., 2015, *J. Chrom. A.*, 1389, 19).

Аффинную модификацию мутантных форм *esMutL* акриламидсодержащими ДНК проводили в буфере – 20 мМ HEPES/КОН (pH 7,5), содержащем 100 мМ KCl, 5 мМ хлорид магния, 100 мкМ АТФ (30 мин, 0 градусов С). В случае белка *esMutS(N497C)* концентрация HEPES - 25 мМ, а KCl – 125 мМ. Образование конъюгатов детектировали методом гель-электрофореза по Лэммли.

Способность *rsMutS* образовывать комплексы с дуплексом, содержащим G/T-пару, оценивали методом «торможения в геле» или по увеличению анизотропии флуорофора, содержащегося в ДНК. Реакцию проводили в 20 мМ буфере HEPES/КОН (pH 7,5), 5 мМ MgCl₂, 125 мМ KCl в присутствии 1 мМ АДФ. Использовали 41- или 43-звенные дуплексы, содержащие на 3'-конце одной из цепей флуорофоры FAM или TAMRA. Изменение анизотропии флуорофора TAMRA в составе ДНК регистрировали в 96-луночных планшетах с низкой сорбцией на приборе VICTOR Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer), используя фильтры 555 нм для возбуждения и 610 нм для эмиссии.

Для модификации бета-«зажима» малеимидное производное Alexa-594 (Thermo Scientific), растворяли в ДМСО, затем добавляли к раствору белка в 5-кратном избытке и инкубировали 1 ч при 0 градусов С. Увеличение времени инкубации не повышало степень модификации бета-«зажима». Белок очищали от избытка реагента с помощью набора для удаления флуоресцентных красителей (Thermo Scientific) и анализировали методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях. Степень модификации белка оценивали по интенсивности флуоресценции соответствующей зоны.

Для оценки влияния неканонических структур ДНК на функционирование *rsMutL* использовали ковалентнозамкнутые ДНК. Для их получения сконструированы пары комплементарных олигонуклеотидов с три- и тетрануклеотидными повторами, фланкированными нуклеотидными последовательностями таким образом, чтобы при их смешивании получались дуплексы с «липкими» концами, соответствующими сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции Sall и HindIII. Эти дуплексы встраивали в

полилинкерный участок плазмиды pUC19, предварительно обработанной этими ферментами. Сконструированная плазида была введена в компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue методом «теплового шока» с последующей бело-голубой селекцией колоний. Плазмидные ДНК выделяли из клеток *E. coli* методом щелочного лизиса с помощью набора GeneJet (Thermo Scientific) (рис. 5).

Расщепление плазмид эндонуклеазой rsMutL проводили в 10 мМ буфере HEPES/КОН (рН 8,0), 5 мМ MnCl₂, 125 мМ KCl (1 ч, 37 градусов С). Реакционные смеси анализировали в 1%-ном агарозном геле с последующим окрашиванием раствором бромид этидия. Линейные флуоресцентно меченные дуплексы, имеющие или не имеющие в своем составе G-квадруплекс, гидролизировали эндонуклеазой MutH в 20 мМ буфере HEPES/КОН (рН 8,0), 5 мМ MgCl₂, содержащем 60, 100 или 120 мМ KCl с последующим разделением проб в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (рис. 3Б).

Культуры клеток *R. sphaeroides* выращивали в малат-минимальной среде при 32 градусах С в темноте (в случае фототрофных условий - на свету) и постоянном перемешивании со скоростью 140 об./мин (в случае микроаэробного и аэробного роста, в случае фототрофного и анаэробного - перемешивание не требуется). При анаэробных условиях роста в среду добавляли ДМСО (до финальной концентрации 60 мМ) в качестве акцептора электронов. Измерение оптической плотности проводили спектрофотометрически при длине волны 660 нм.

3.7.2. Вклад каждого члена коллектива в выполнение Проекта в 2016 году

Абросимова Л.А. - анализ кинетики взаимодействия белков с ДНК методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре.

Андреева Н.А. - оценка влияния квадруплекса в составе ДНК-дуплекса на функционирование эндонуклеазы MutH.

Буренина О.Ю. - проведение сайт-направленного мутагенеза генов белков rsMutS и rsMutL.

Гавшина А.В. - выделение белков rsMutL, rsMutS и бета-«зажима».

Долинная Н.Г. - получение плазмидных конструкций, содержащих три- и тетрануклеотидные повторы, анализ их гидролиза rsMutL.

Елкина Д.А. - исследование роста бактерии *R. sphaeroides* в различных условиях.

Кузнецов Н.А. - подбор условий для изучения взаимодействия esMutL с ДНК методом «остановленной струи».

Монахова М.В. - синтез реакционноспособных ДНК и их кросслинкинг с MutL и MutS.

Романова Е.А. - синтез линейных фрагментов ДНК.

Кубарева Е.А. - руководство проектом, планирование экспериментов, подготовка публикаций и отчета.

3.8.1. Количество научных работ по Проекту, опубликованных в 2016 году

8

3.8.1.1. Из них в изданиях, включенных в перечень ВАК

4

3.8.1.2. Из них в изданиях, включенных в библиографическую базу данных РИНЦ

4

3.8.1.3. Из них в изданиях, включенных в международные системы цитирования (библиографические и реферативные базы научных публикаций)

4

- 3.8.2. Количество научных работ, подготовленных в ходе выполнения Проекта и принятых к печати в 2016 году**
1
- 3.9. Участие в 2016 году в научных мероприятиях по тематике Проекта**
1. V Съезд биохимиков России, 4-9.10.2016, г. Сочи, Россия (1 устный и 2 стендовых доклада).
2. V Всероссийский симпозиум с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов. Роль separation science в развитии прорывных направлений современной науки (нанохимия и биомедицина)», 30.10-6.11.2016, г. Сочи, Россия (стендовый доклад).
- 3.10. Участие в 2016 году в экспедициях по тематике Проекта, которые проводились при финансовой поддержке Фонда**
Нет
- 3.11. Финансовые средства, полученные в 2016 году от Фонда(в руб.)**
450000,00
- 3.12. Адреса (полностью) ресурсов в Интернете, подготовленных авторами по данному проекту**
Нет
- 3.13. Библиографический список всех публикаций по проекту за весь период выполнения проекта, в порядке значимости:**
1. Abrosimova L.A., Kubareva E.A., Migur A.Yu., Gavshina A.V., Ryazanova A.Yu., Norkin M.V., Perevyazova T.A., Wende W., Hianik T., Zheleznaya L.A., Oretskaya T.S. Peculiarities of the interaction of the restriction endonuclease BspD6I with DNA containing its recognition site. - *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 2016, v. 1864, p. 1072-1082. Импакт-фактор – 3,280.
 2. Долинная Н.Г., Оглоблина А.М., Якубовская М.Г. Структура, свойства и биологическое значение G-квадруплексов ДНК и РНК. Взгляд через 50 лет после их открытия. - *Успехи биологической химии*, 2016, т. 56, с. 53-154. Импакт-фактор – 1,353.
 3. Пенкина А.И., Шилкин Е.С., Павлова А.В., Фридрих П., Кубарева Е.А. Белок MutL из системы репарации ДНК-«мисматчей»: взаимодействие с молекулярными партнерами. - *Acta Naturae*, 2016, спецвыпуск, т. 2, с. 9. Импакт-фактор – 1,790.
 4. Гавшина А.В., Андреева Н.А., Монахова М.В., Оглоблина А.М., Долинная Н.Г., Кубарева Е.А. Влияние неканонических структур ДНК на функционирование системы репарации «мисматчей». - *Acta Naturae*, 2016, спецвыпуск, т. 2, с. 14. Импакт-фактор – 1,790.
 5. Монахова М.В., Рязанова А.Ю., Кубарева Е.А., Фридрих П. Изучение короткоживущих комплексов системы репарации мисматчей *E. coli* с помощью фиксации белка MutS на ДНК. – Материалы международной конференции «Химическая биология», посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре, 24-28 июля 2016 г., г. Новосибирск, Россия, с. 112.
 6. Кубарева Е.А., Монахова М.В., Рязанова А.Ю., Фридрих П. Хроматографически чистые конъюгаты белка MutS с ДНК как инструменты исследования начальных этапов процесса исправления повреждения в ДНК. - Тезисы докладов V Всероссийского

симпозиума с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов. Роль separation science в развитии прорывных направлений современной науки (нанохимия и биомедицина)», 30 октября – 6 ноября 2016 г., г. Сочи, Россия, с. 227.

7. Монахова М.В., Рязанова А.Ю., Кубарева Е.А., Фридрих П. Ковалентная фиксация белков реакционноспособными аналогами ДНК как метод изучения начальных этапов функционирования системы репарации неканонических пар нуклеотидов. – Сборник тезисов XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 8-11 февраля 2016 г., г. Москва, Россия, с. 122.

8. Корепина Ю.О., Монахова М.В. Изучение взаимодействия белков MutS и MutL системы репарации *E. coli* с модифицированными ДНК, содержащими акриламидную группу. – Материалы VII научной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы», 11-15 апреля 2016 г., г. Москва, Россия, с. 810.

9. Абросимова Л.А. Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции VspD6I и конъюгаты гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами: особенности взаимодействия с ДНК. - Автореферат дисс. на соискание уч. степени канд. хим. наук, г. Москва, 2016, с. 1-22, в печати.

Подпись Руководителя проекта

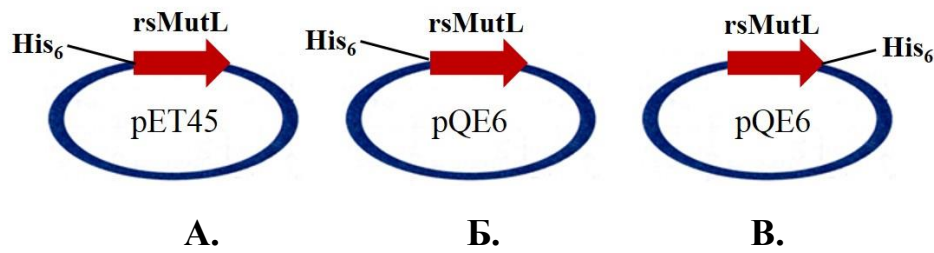
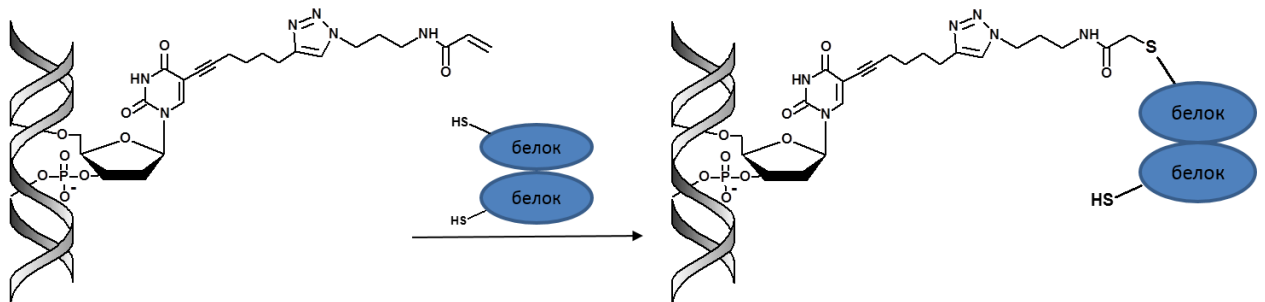


Рис. 1. Плазмидные конструкции, содержащие ген белка *rsMutL*.

А.



Б.

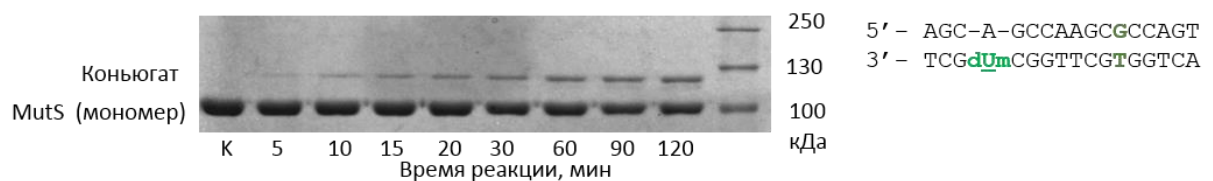
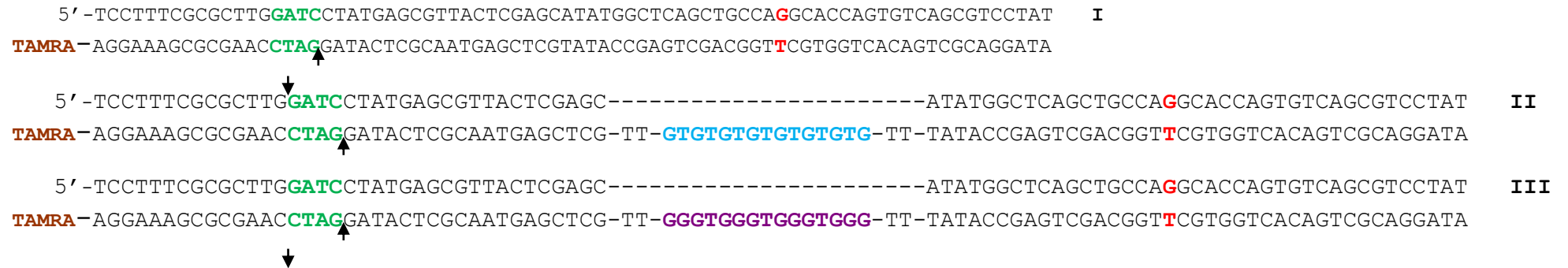


Рис. 2. Взаимодействие ДНК-фрагмента, содержащего акриламидную группировку, с остатком цистеина белка. А – схема реакции, R₁ и R₂ – фрагменты олигонуклеотидной цепи. Б – Ковалентное связывание белка *esMutS(N497C)* с 17-звенным ДНК-дуплексом (приведен справа, *dUm* – модифицированное звено). На геле, окрашенном раствором Кумасси, продемонстрирована эффективность образования ДНК-белкового конъюгата в зависимости от времени реакции. Справа от геля указаны маркеры молекулярной массы белков (кДа).

А.



Б.

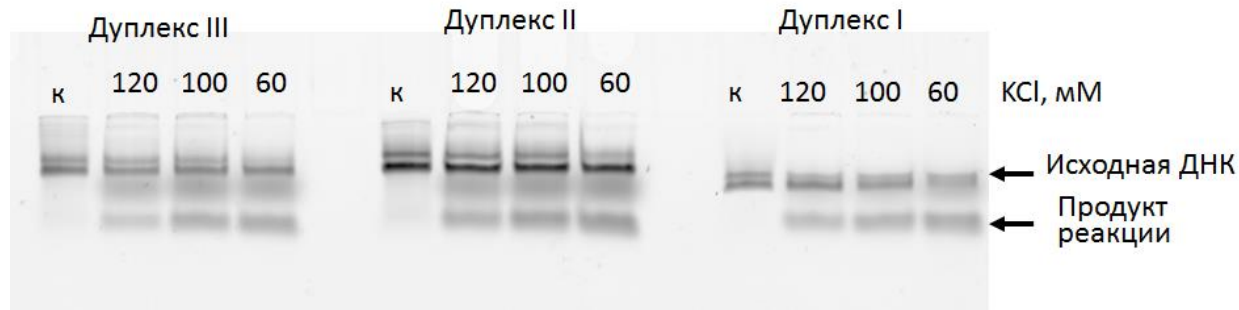


Рис. 3. А – ДНК-дуплексы, сконструированные для изучения влияния G-квадруплекса на функционирование системы MMR. Красным выделен «мисматч», зеленым – участок узнавания эндонуклеазы MutH, фиолетовым – структура, формирующая квадруплекс, голубым – чередующаяся GT/CA-последовательность. Стрелками обозначены места гидролиза ДНК ферментом MutH. **Б** – Анализ расщепления дуплексов **I-III**, содержащих флуорофор TAMRA на 3'-конце «нижней» цепи, эндонуклеазой MutH в 10%-ном геле, содержащем 7 М мочевины и 10% формамид. **к** – дорожки с исходным фрагментом ДНК. Реакцию проводили в 20 мМ буфере HEPES/КОН (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, содержащем 60, 100 или 120 мМ KCl при 37°C в течение 1 ч.

А. УСЛОВИЯ:

микроаэробные



аэробные



фототрофные



анаэробные



Б.

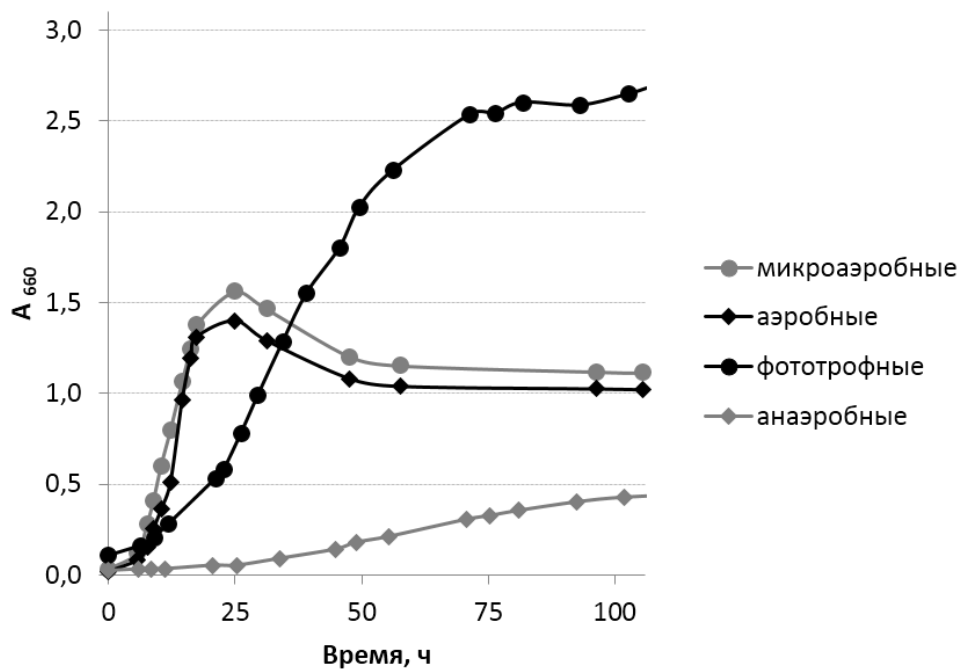


Рис. 4. Анализ роста клеток дикого типа *R. sphaeroides*. **А** – Условия роста клеток: микроаэробные и аэробные (в темноте, но с различным уровнем аэрации), фототрофные (в отсутствие кислорода на свету), анаэробные (в отсутствие кислорода и в темноте). **Б.** – Кривые роста клеток.

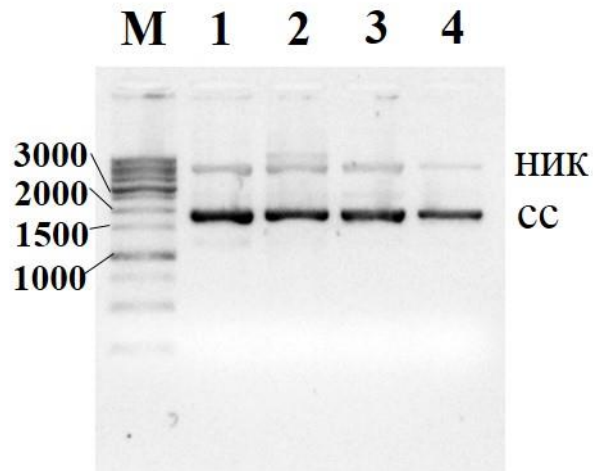


Рис. 5. Фотография 1%-ного агарозного геля, демонстрирующего качество плазмидных ДНК. Дорожка 1 - исходная плазмида pUC19; дорожка 2 - pUC19 со вставкой, содержащей 12 повторов GGT; дорожка 3 - pUC19 со вставкой, содержащей 8 повторов GGGT, дорожка 4 - pUC19 со вставкой, содержащей 20 повторов GGT. Дорожка М – маркер длины ДНК, пары нуклеотидов. **сс** - суперскрученная форма плазмиды, **ник** - плазмида с одноцепочечным разрывом. Гель прокрашен раствором бромид этидия.

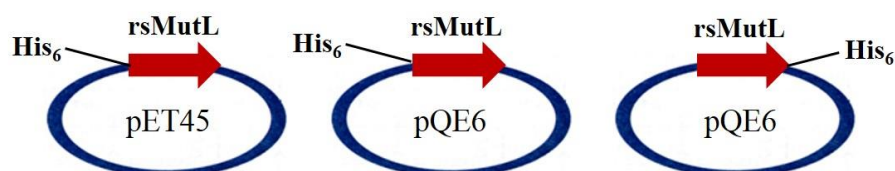
Инициация репарации «мисматчей» белком MutL из альфа-протеобактерии *Rhodobacter sphaeroides*: факторы, определяющие гидролиз и дискриминацию цепей ДНК

В живых организмах от бактерий до человека существует система репарации неканонических пар нуклеозидов («мисматчей») и небольших петель, получившая название MMR (от англ. *mismatch repair system*). Нарушение функционирования MMR на одном из этапов репарации приводит к накоплению мутаций. Репарация «мисматчей» инициируется в результате узнавания «мисматча» белком MutS и формирования комплекса MutS-MutL, который предположительно регулирует последующие этапы репарации.

Цель проекта: характеристика свойств и функций белка MutL из системы MMR *Rhodobacter sphaeroides* (rsMutL), обладающего эндонуклеазной активностью, и выяснение его взаимодействия с молекулярными партнерами.

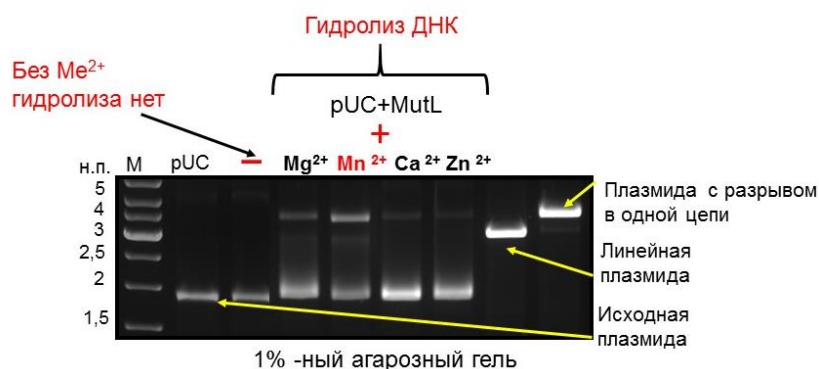
Основные результаты

I. Созданы три плазмидные конструкции, несущие ген rsMutL.



Использование штамма BL21(DE3)pLysS *E. coli* позволило уменьшить скорость синтеза и количество rsMutL в клетке и увеличить его растворимость.

Активность белка тестировали по его способности вносить одноцепочечный разрыв в специально сконструированную плазмиду pUC-MMR, содержащую «мисматч» G/T.



Фермент наиболее эффективно гидролизует плазмидную ДНК в присутствии ионов Mn^{2+} . Ионы Zn^{2+} практически не стимулируют эндонуклеазную функцию rsMutL, что позволяет предположить их важность для стабилизации структуры белка.

II. Синтезированы линейные протяжённые ДНК-субстраты, содержащие и не содержащие разрыв в одной из цепей, для исследования специфичности действия rsMutL, а также дуплексы с пиридилдисульфидной группировкой для последующего селективного кросслинкинга мутантных форм белков rsMutS и rsMutL.

III. На примере структурного и функционального аналога rsMutL - никующей эндонуклеазы VspD6I, отработаны условия исследования кинетики взаимодействия белков с эндонуклеазной функцией с ДНК-дуплексами методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре.

IV. Впервые предпринято изучение влияния тринуклеотидных повторов на реализацию эндонуклеазной функции MutL бактерий. В случае тринуклеотидного повтора (GGT/ACC)_n его G-богатая цепь может складываться во внутримолекулярный G-квадруплекс.



Наличие 12 повторов GGT/ACC не влияет на функционирование rsMutL.

V. В системе MMR *E. coli* функцию первоначального гидролиза дефектной цепи выполняет эндонуклеаза MutH, которая является аналогом эндонуклеазного домена rsMutL.

Наличие G-квадруплекса в линейной ДНК не ингибирует функционирование этого фермента (Рис. 1).



Рис. 1. Анализ расщепления дуплексов, содержащих флуорофор TAMRA на 3'-конце «нижней» цепи, эндонуклеазой MutH в 10%-ном геле, содержащем 7 М мочевины и 10% формамид. к – дорожки с исходным фрагментом ДНК. Реакцию проводили в 20 мМ буфере HEPES/КОH (рН 8,0), 5 мМ MgCl₂, содержащем 60, 100 или 120 мМ KCl при 37°C в течение 1 ч.

VI. Проанализированы кривые роста клеточных культур *R. sphaeroides* в микроаэробных, аэробных, фототрофных и анаэробных условиях, отличающихся уровнем аэрации и наличием/отсутствием света (Рис. 2). Предложено получать клеточные экстракты *R. sphaeroides* для оценки активности rsMutS и rsMutL в микроаэробных условиях.

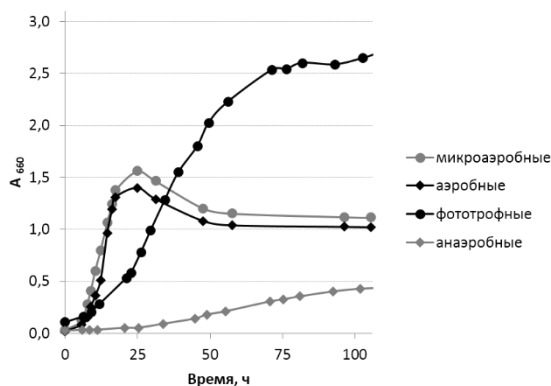
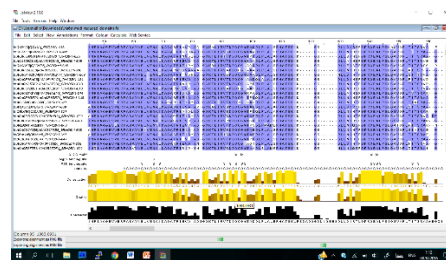
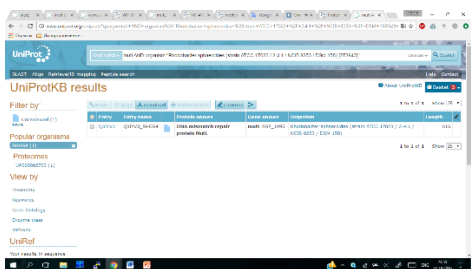


Рис. 2. Кривые роста клеток *R. sphaeroides* в различных условиях:



VII. Выполнен поиск аминокислотных последовательностей, гомологичных последовательности rsMutL в базе данных UniProt. Проведен сравнительный анализ более 400 последовательностей. На основе выявленной гомологии выделены домены и участки связывания лигандов в белке rsMutL.



1. Abrosimova L.A., Kubareva E.A., Migur A.Yu., Gavshina A.V., Ryazanova A.Yu., Norkin M.V., Perevyazova T.A., Wende W., Hianik T., Zheleznaya L.A., Oretskaya T.S. Peculiarities of the interaction of the restriction endonuclease BspD6I with DNA containing its recognition site. - Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics, 2016, v. 1864, p. 1072-1082. Импакт-фактор – 3,280.

Структурными и функциональными аналогами белков MutL с эндонуклеазной функцией являются никующие эндонуклеазы (НЭ). Эти ферменты узнают специфическую последовательность в двуцепочечной ДНК и гидролизуют только одну цепь в определенной позиции. Они участвуют в процессах репликации и репарации ДНК, а также могут входить в состав бактериальных гетеродимерных эндонуклеаз рестрикции. Понимание механизма их действия может помочь в выяснении вопроса о специфичности действия белков MutL. Одним из таких ферментов является эндонуклеаза рестрикции BspD6I (ЭР BspD6I), обнаруженная в штамме *Bacillus species* D6 и состоящая из большой субъединицы – никующей эндонуклеазы BspD6I (НЭ BspD6I), и малой субъединицы (МС BspD6I). Впервые показано, что НЭ BspD6I индуцирует изгиб ДНК при формировании комплекса. Обнаружено, что НЭ BspD6I способна образовывать комплекс с продуктом собственного гидролиза. Продемонстрировано, что для характеристики взаимодействия НЭ с ДНК удобно использовать метод акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре. МС BspD6I может вносить второй разрыв в ДНК одновременно с БС BspD6I. Полученные результаты свидетельствуют о том, что БС BspD6I осуществляет координацию МС BspD6I, тесная взаимосвязь двух субъединиц обеспечивает эффективное функционирование ЭР BspD6I.

2. Долинная Н.Г., Оглоблина А.М., Якубовская М.Г. Структура, свойства и биологическое значение G-квадруплексов ДНК и РНК. Взгляд через 50 лет после их открытия. - Успехи биологической химии, 2016, т. 56, с. 53-154. Импакт-фактор – 1,353.

В настоящее время помимо классической «Уотсон-Криковской» спирали охарактеризовано более десятка неканонических вторичных структур ДНК. Они широко распространены в геноме и играют важную роль в различных биологических процессах. Одной из таких структур являются G-квадруплексы. Они могут образовываться при физиологических условиях из гуанин-богатых последовательностей, в которых мотив не менее, чем из трех dG, повторяется не менее четырех раз. В обзоре проанализированы данные публикаций последних лет, которые существенно изменили научные взгляды на структурный полиморфизм G-квадруплексов, термодинамику и кинетику их образования–разрушения, на факторы, влияющие на равновесие между ДНК-дуплексами и неканоническими четырехспиральными формами ДНК, на структурную организацию мультиквадруплексных систем.

G-квадруплексы участвуют в таких важных процессах как регуляция транскрипции ДНК, репликация ДНК, регуляция активности теломеразы. Кроме того, G-квадруплексы могут являться источником генетической нестабильности, что следует учитывать при изучении функционирования белков систем репарации. Особое внимание в обзоре уделено новым экспериментальным подходам, с помощью которых осуществлен прорыв в изучении квадруплексов и их визуализации в биологических объектах.

3. Пенкина А.И., Шилкин Е.С., Павлова А.В., Фридрих П., Кубарева Е.А. Белок MutL из системы репарации ДНК-«мисматчей»: взаимодействие с молекулярными партнерами. - Acta Naturae, 2016, спецвыпуск, т. 2, с. 9. Импакт-фактор – 1,790.

Центральную роль в координации различных этапов MMR выполняет белок MutL, который «получает сигнал» об обнаружении «мисматча» от белка MutS и направляет эксцизионную репарацию в дочерней цепи ДНК. Полагают, что внесение разрыва в ДНК в

большинстве организмов выполняют гомологи MutL, у которых обнаружен эндонуклеазный мотив. Однако механизм этого процесса практически не исследован. Одним из таких организмов является бактерия *Rhodobacter sphaeroides*, которая способна выживать в различных стрессовых условиях. Нами впервые выделен белок MutL из *R. sphaeroides* (rsMutL). Показано, что он обладает эндонуклеазной функцией. Степень расщепления ДНК rsMutL увеличивается в ряду $Cd^{2+} < Mg^{2+} < Co^{2+} < Mn^{2+}$. Продемонстрировано, что АТФ значительно ингибирует способность rsMutL расщеплять ДНК.

Исследования взаимодействия MutL с ДНК затруднены из-за динамического характера структуры этого белка, принимающего множество различных конформаций. Нами разработан подход, позволяющий фиксировать MutL на ДНК при взаимодействии тиольной группы остатка Cys этого белка с пиридилдитиогруппой в составе синтетического ДНК-дуплекса.

4. Гавшина А.В., Андреева Н.А., Монахова М.В., Оглоблина А.М., Долинная Н.Г., Кубарева Е.А. Влияние неканонических структур ДНК на функционирование системы репарации «мисматчей». - Acta Naturae, 2016, спецвыпуск, т. 2, с. 14. Импакт-фактор – 1,790.

Одной из основных задач системы репарации неканонических пар нуклеотидов или «мисматчей» (MMR) является поддержание генетической стабильности организма. С другой стороны, система MMR сама может выступать источником генетических ошибок. В частности, показано, что белки – компоненты системы MMR, способствуют экспансии повторяющихся участков ДНК. Последовательность нуклеотидных повторов обуславливает образование неканонических структур ДНК, например, G-квадруплексов. Известно, что MutS из *E. coli* эффективно связывает ДНК, содержащую квадруплекс. Предполагается отсутствие инициации репарации в такой системе. Однако эта гипотеза не имеет экспериментального подтверждения. Также остается открытым вопрос о влиянии квадруплексов на другие белки системы MMR, в частности MutL и MutH.

Прямым олигонуклеотидным синтезом были получены флуоресцентно меченные 95- и 76-звенные компоненты для формирования серии дуплексов, содержащих сайт расщепления MutH, вставку квадруплексного мотива и G/T-пару. Показано, что для моделирования функциональной ДНК со вставками неканонических форм оптимальным является расстояние в 36 пар нуклеотидов (п.н.) от участка узнавания MutH до G/T-пары и 14 п.н. до конца дуплекса. Подобраны условия, при которых удастся фиксировать инициацию начальных этапов репарации MMR.

5. Монахова М.В., Рязанова А.Ю., Кубарева Е.А., Фридрих П. Изучение короткоживущих комплексов системы репарации мисматчей *E. coli* с помощью фиксации белка MutS на ДНК. – Материалы международной конференции «Химическая биология», посвященной 90-летию академика Д.Г. Кнорре, 24-28 июля 2016 г., г. Новосибирск, Россия, с. 112.

В гомогенном состоянии получены конъюгаты мутантных форм MutS(N497C) и MutS(A336C) с ДНК. В первом случае ДНК зафиксирована в области MutS, сближенной с ДНК, но не участвующей в распознавании «мисматча», во втором – в полости, формирующейся при изменении конформации белка на «скользящий зажим». Методом FRET показана способность выделенных комплексов MutS-ДНК взаимодействовать с MutL. Показано, что комплекс MutS(N497C)-ДНК является предпочтительным для привлечения MutL и дальнейшей активации всей системы MMR.

Изучена кинетика образования комплекса MutL с MutS в составе конъюгата для разных конформационных состояний белка MutL («открытая» и «закрытая» формы). Продемонстрировано, что скорость образования тройного комплекса MutL-MutS-ДНК и его количество зависят не только от места «сшивки» MutS с ДНК, но и от длины линкера

между белком и ДНК. Предложенный подход позволяет выяснить положение ДНК относительно MutS и MutL в тройном комплексе на определенной стадии функционирования системы репарации.

6. Кубарева Е.А., Монахова М.В., Рязанова А.Ю., Фридрих П. Хроматографически чистые конъюгаты белка MutS с ДНК как инструменты исследования начальных этапов процесса исправления повреждения в ДНК. - Тезисы докладов V Всероссийского симпозиума с международным участием «Кинетика и динамика обменных процессов. Роль separation science в развитии прорывных направлений современной науки (нанохимия и биомедицина)», 30 октября – 6 ноября 2016 г., г. Сочи, Россия, с. 227.

Продемонстрирована возможность получения конъюгатов с ДНК на примере белка MutS из системы репарации некомплементарных пар нуклеотидов («мисматчей») *E. coli*, очистки их от непрореагировавших компонентов – исходного белка и ДНК-фрагмента, методом анионообменной хроматографии. Показано, что MutS, зафиксированный на ДНК, сохраняет свою активность. Находясь в составе конъюгата, белок способен «разгибать» ДНК после добавления АТФ. Конъюгаты MutS-ДНК использованы для выяснения их способности взаимодействовать с белком-координатором системы репарации - MutL. Изучена кинетика образования комплекса MutL, находящегося в различных конформационных состояниях, с MutS-ДНК. Продемонстрировано, что скорость образования тройного комплекса MutL-MutS-ДНК и его количество существенным образом зависят от локализации аминокислотного остатка MutS, с которым ковалентно связана ДНК.

7. Монахова М.В., Рязанова А.Ю., Кубарева Е.А., Фридрих П. Ковалентная фиксация белков реакционноспособными аналогами ДНК как метод изучения начальных этапов функционирования системы репарации неканонических пар нуклеотидов. – Сборник тезисов XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 8-11 февраля 2016 г., г. Москва, Россия, с. 122.

Для фиксации короткоживущих и конформационно подвижных комплексов, образующихся в процессе функционирования системы репарации неканонических пар нуклеотидов, использован метод ковалентного присоединения (кросслинкинга) белка MutS к ДНК, содержащей пиридилдисульфидную группу. Активность белка в полученном комплексе, тестируемая по его способности изменять конформацию и сгибать/разгибать ДНК, продемонстрирована методом флуоресцентного резонансного переноса энергии. Измерена кинетика процесса перехода белка в конформационно активное состояние (так называемый «скользящий зажим») с помощью метода «остановленной струи». Показано, что скорость конформационного перехода в белке зависит от концентрации АТФ.

8. Корепина Ю.О., Монахова М.В. Изучение взаимодействия белков MutS и MutL системы репарации *E. coli* с модифицированными ДНК, содержащими акриламидную группу. – Материалы VII научной конференции молодых ученых «Инновации в химии: достижения и перспективы», 11-15 апреля 2016 г., г. Москва, Россия, с. 810.

Для ковалентной фиксации белков на ДНК использованы модифицированные фрагменты ДНК, содержащие акриламидную группу в положении 5-дезоксисуридина на линкерах различной длины. Акриламидная группа может реагировать с SH-группами остатков цистеина белка. В качестве объекта исследования использована мутантная форма белка MutS(N497C). Показано, что белок MutS эффективно и специфично связывается с синтетическим ДНК-дуплексом, содержащим dU с реакционноспособной группой на расстоянии четырёх нуклеотидов с 5'-стороны от некомплементарной G/T- пары. Выход

конъюгата MutS(N497C) с таким дуплексом достигал 20%. Эффективность ковалентного связывания белка с ДНК существенно зависит от длины линкера, на котором находится акриламидная группа. Дикий тип белка MutS и мутантная форма белка, не содержащая остатков цистеина, не вступают в реакцию с модифицированными ДНК. Это говорит о селективности взаимодействия акриламидной группы в составе олигодезоксирибонуклеотида со сближенным с ДНК остатком цистеина. Белок MutL не реагирует с ДНК, что может быть связано с меньшей стабильностью комплекса MutL-ДНК.

9. Абросимова Л.А. Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD6I и конъюгаты гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами: особенности взаимодействия с ДНК. - Автореферат дисс. на соискание уч. степени канд. хим. наук, г. Москва, 2016, с. 1-22, в печати.

Получены данные о свойствах гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции BspD6I и конъюгатах гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами, которые могут быть использованы для конструирования ферментов с новыми характеристиками. Результаты исследования могут также служить основой при создании химерных нуклеаз, где в качестве ДНК-гидролизующего модуля будут выступать никующие эндонуклеазы, такие как BspD6I и MutL. Конструирование химерных нуклеаз является актуальной задачей современной биотехнологии. Разработан подход для регулирования активности гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с помощью температуры. Он достаточно универсален и может быть использован для воздействия на активность других гомодимерных белков, например, белков системы репарации «мисматчей» MutS и MutL.