

На правах рукописи



Абросимова Людмила Алексеевна

**ГЕТЕРОДИМЕРНАЯ ЭНДОНУКЛЕАЗА РЕСТРИКЦИИ *Bsp*D6I И
КОНЬЮГАТЫ ГОМОДИМЕРНОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ
РЕСТРИКЦИИ *Sso*II С ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДАМИ:
ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ДНК**

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2016

Работа выполнена на факультете Биоинженерии и биоинформатики и на кафедре химии природных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

Кубарева Елена Александровна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Официальные оппоненты:

Пышный Дмитрий Владимирович, доктор химических наук, член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией биомедицинской химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения РАН.

Вейко Наталья Николаевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр РАМН».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биофизики клетки РАН» (г. Пущино).

Защита состоится февраля 2017 года в 16⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета Д 501.001.41 по химическим наукам при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, Институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, аудитория 501.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова www.chem.msu.ru.

Автореферат разослан

Учёный секретарь
Диссертационного совета,
кандидат химических наук,
доцент



Смирнова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эндонуклеазы рестрикции (ЭР), ферменты, узнающие в двутяжевой ДНК специфические последовательности и гидролизующие их в обеих цепях ДНК в строго фиксированном месте относительно участка узнавания, являются основными инструментами генетической инженерии. Данный класс ферментов представляет собой разнородную группу: аминокислотные последовательности даже схожих по свойствам ЭР обладают низкой степенью идентичности, значительно различается также структурно-функциональная организация ЭР. Среди ЭР выделяют класс никующих эндонуклеаз (НЭ) – ферментов, вносящих разрыв только в одну из цепей ДНК. Такие НЭ, как правило, являются одной из субъединиц гетеродимерных ЭР.

Первая НЭ BstSEI, входящая в состав системы рестрикции–модификации (P–M), была обнаружена Абдурашитовым и др. в 1996 г. В настоящее время, согласно базе данных REBASE, к НЭ относят всего 36 ферментов как встречающихся в природе, так и искусственно сконструированных. Из них 14 ферментов – коммерчески доступны. Еще для более чем 3400 эндонуклеаз предсказывают никазную активность. Стремительно расширяется область применения НЭ. Их используют для изотермической амплификации олигонуклеотидов и геномной ДНК (*Van Ness et al., 2003*), для экономного клонирования ДНК, не требующего ферментативного лигирования (*Yang et al., 2010*), для оптического картирования ДНК (*Xiao et al., 2007*). Однако детальный механизм их взаимодействия с ДНК остаётся неизученным, что ограничивает круг методов, основанных на использовании этих ферментов.

ЭР и НЭ применяются при конструировании высокоспецифичных химерных белков, используемых в генной терапии (*Gabsalilow et al., 2013*). Однако их неконтролируемое функционирование может привести к нежелательным последствиям для клетки. Поэтому актуальной проблемой является разработка подходов направленного «включения» и «выключения» активности ЭР и НЭ с помощью внешнего сигнала.

Модельными ферментами в ходе работы являлись термофильная гетеродимерная ЭР VspD6I и мезофильная гомодимерная ЭР SsoII. Выбор объектов обусловлен их отличием в субстратной специфичности, структуре и механизме действия. ЭР VspD6I обнаружена в 2001 г. в штамме *Vacillus species D6* (*Железная и др., 2001*). Этот фермент состоит из большой и малой субъединиц (БС и МС, соответственно). Интересно, что БС также является НЭ и способна функционировать в изолированном виде. Имеются кристаллические структуры отдельно взятых БС и МС, однако детальный механизм их взаимодействия между собой в составе ЭР VspD6I и с ДНК неясен. Это определяет актуальность изучения биохимических свойств ЭР VspD6I, а также ее комплексов с ДНК.

ЭР SsoII обнаружена в бактерии *Shigella sonnei* и механизм ее взаимодействия с ДНК достаточно хорошо изучен (*Кубарева, 2007*). Известно, что формирование конъюгатов ферментов (в том числе и нуклеаз) с олигонуклеотидами может приводить к значительному изменению свойств белка (*Eisenschmidt et al., 2005*). Детальное знание структуры ЭР SsoII и механизма ее функционирования позволило предположить, что

конструирование конъюгатов этой ЭР с ДНК также может привести к значительному изменению каталитических свойств фермента и, как следствие, разработке новых направлений его использования при решении задач молекулярной биологии.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось получение новой информации о функционировании гетеродимерных ЭР, одна из субъединиц которых является НЭ (на примере ЭР VspD6I), конструирование и изучение свойств конъюгатов гомодимерных ЭР с ДНК-фрагментами (на примере ЭР SsoII), а также модулирование активности этих ферментов для расширения границ их практического использования.

В ходе работы необходимо было решить следующие задачи.

1. Охарактеризовать свойства ЭР VspD6I и выявить особенности ее взаимодействия с ДНК-фрагментами, как немодифицированными, так и модифицированными.
2. Предложить подход для регулирования активности НЭ VspD6I с использованием синтетических ДНК-дуплексов.
3. Сконструировать конъюгаты ЭР SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами и изучить способность таких конъюгатов гидролизовать ДНК в различных условиях.

Основным инструментом для решения поставленных задач являлись синтетические фрагменты ДНК различной длины и структуры. Для изучения особенностей функционирования ЭР нами впервые использованы ДНК-дуплексы, содержащие нуклеозидные вставки с остатками азобензола, который способен к *транс-цис*-изомеризации.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые показано, что для протекания ферментативной реакции гидролиза ДНК, катализируемой ЭР VspD6I достаточно, чтобы фланкирующие последовательности ДНК-субстрата с 5'-конца от участка узнавания составляли 2 пары нуклеотидов (п.н.), а с 3'-конца от места гидролиза – 3 п.н. В то же время только 4 п.н. с 5'-конца от участка узнавания обеспечивают формирование стабильного фермент-субстратного комплекса. Установлено, что при связывании НЭ VspD6I изгибает ДНК-субстрат на $66 \pm 4^\circ$ и способна образовывать комплекс с продуктом собственного гидролиза.

Продемонстрировано, что МС VspD6I повышает эффективность гидролиза субстрата НЭ VspD6I, в то время как связывание и расщепление ДНК НЭ VspD6I необходимы для функционирования МС VspD6I, что свидетельствует о тесной взаимосвязи субъединиц в процессе функционирования ЭР VspD6I.

С помощью ДНК-дуплексов с нуклеозидными вставками, содержащими остаток азобензола, впервые показано, что НЭ VspD6I образует контакт с углеводофосфатным остовом в «нижней» цепи ДНК в позиции, расщепляемой МС VspD6I. Предсказано наличие контактов МС VspD6I с ДНК, причем не только с местом гидролиза ДНК в «нижней» цепи, но также и вблизи участка узнавания. Установлено, что введение азобензольной вставки на расстоянии двух звеньев с 5'-конца от места гидролиза в «верхней» цепи приводит к изменению специфичности действия МС VspD6I:

преимущественное расщепление «нижней» цепи ДНК наблюдается на расстоянии 5-ти, а не 6-ти звеньев с 5'-конца от участка узнавания (рис. 1).

Для регулирования активности НЭ VspD6I в диапазоне температур от 25 до 45°C предложено использовать негидролизуемые аналоги субстрата этого фермента с одноцепочечными разрывами. Выступая в качестве конкурентных ингибиторов, они блокируют действие фермента при 25°C. При повышении температуры реакционной смеси до 45°C происходит диссоциация дуплекса-ингибитора из комплекса с ферментом и восстановление активности НЭ VspD6I.

Впервые синтезированы конъюгаты гомодимерной ЭР SsoII с ДНК-фрагментами. Показано, что такие конъюгаты каталитически неактивны при 25°C, в то время как немодифицированный фермент эффективно гидролизует субстрат при этой температуре. При 45°C способность ДНК-белкового конъюгата расщеплять субстрат восстанавливается.

Полученные данные о свойствах гетеродимерной ЭР VspD6I и конъюгатах гомодимерной ЭР SsoII с олигодезоксирибонуклеотидами 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 НЭ. Конструирование таких химерных нуклеаз является актуальной задачей современной биотехнологии (*Katz et al., 2014*). Разработанный подход для регулирования активности гомодимерной ЭР SsoII с помощью температуры достаточно универсален и может быть использован для воздействия на активность других белков, связывающих субстрат в полости, например, таких как трансмембранные каналы, шапероны.

Публикации и апробация работы. По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в российских и международных периодических изданиях. Результаты были представлены на международных конференциях «Ломоносов-2011» (Москва, Россия, апрель 2011 г.), «6th Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology» (Кембридж, Великобритания, сентябрь 2011 г.), «4th GGL Conference on Life Sciences» (Гиссен, Германия, сентябрь 2011 г.), «Постгеномные технологии в биомедицине» (Новосибирск, Россия, июнь 2012 г.), «38th FEBS Congress» (Санкт-Петербург, Россия, июль 2013 г.), «Ломоносов-2014» (Москва, Россия, апрель 2014 г.), «15th IUBMB-24th FAOVMB-TSBMB International Conference» (Тайбэй, Тайвань, октябрь 2014 г.) и на конференции «Химическая биология-2016» (Новосибирск, Россия, июль 2016 г.).

Структура и объем диссертационной работы. Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы (посвящен способам конструирования искусственных НЭ и их использованию в генетической инженерии), обсуждение результатов, экспериментальную часть, выводы и список литературы (202 ссылки). Материал иллюстрирован 91 рисунком, 11 таблицами и 3 схемами. Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ (проекты 16-34-00630, 16-04-00575) и программы РФФИ-ННИО «Международные исследовательские группы с участием молодых ученых».

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ¹

1. Особенности взаимодействия гетеродимерной ЭР VspD6I с ДНК

В состав гетеродимерной ЭР VspD6I входят большая субъединица (НЭ VspD6I), состоящая из 604 аминокислотных остатков (а.о.) (молекулярная масса – 70,8 кДа), и малая субъединица (МС VspD6I), состоящая из 186 а.о. (молекулярная масса – 21,6 кДа). ЭР VspD6I узнает в двуцепочечной ДНК последовательность 5'-GAGTC-3'/5'-GACTC-3'. Большая субъединица расщепляет «верхнюю» цепь ДНК на расстоянии 4 п.н. от узнаваемой последовательности в направлении 3'-конца. МС VspD6I гидролизует ДНК как на расстоянии 5 п.н. (~10%), так и на расстоянии 6 п.н. (~90%) нуклеотидов с 5'-конца от участка узнавания в «нижней» цепи ДНК (рис. 1). Гидролиз ДНК происходит в присутствии ионов Mg^{2+} .



Рис. 1. Схема, демонстрирующая места гидролиза ДНК (красные стрелки) гетеродимерной ЭР VspD6I. Зеленым цветом выделен участок узнавания ЭР VspD6I.

Большая субъединица ЭР VspD6I в отсутствие МС VspD6I может осуществлять разрыв в «верхней» цепи ДНК, то есть она является НЭ (*Железная и др., 2002*). В отличие от НЭ VspD6I малая субъединица в изолированном виде не гидролизует субстрат, ее комплекс с ДНК пока не обнаружен. Учитывая данный факт, для характеристики ряда свойств ЭР VspD6I первоначально использовали только НЭ VspD6I.

Методом РСА получены кристаллические структуры отдельно большой и малой субъединиц ЭР VspD6I (*Kachalova et al., 2008*). На основании пространственных структур НЭ VspD6I и МС VspD6I была предложена модель комплекса обеих субъединиц ЭР VspD6I с ДНК (*Kachalova et al., 2008*). Однако механизм взаимодействия ЭР VspD6I с ДНК практически не исследовался. Никующие эндонуклеазы, в том числе и НЭ VspD6I, несмотря на их большую практическую значимость и, вероятно, важную роль в биологических процессах, также остаются малоизученным классом ферментов.

¹ Отдельные части работы были выполнены под руководством проф. А. Пингуда и д-ра В. Венде в Институте биохимии Университета имени Ю. Либиха (г. Гиссен, Германия); под руководством проф. Т. Гианика в отделении ядерной физики и биофизики факультета математики, физики и вычислительной техники Университета имени Коменского (г. Братислава, Словакия).

1.1. Определение угла изгиба ДНК, индуцируемого никующей эндонуклеазой VspD6I

С помощью метода круговых перестановок (*Ferrari et al., 1992*) нами впервые показано, что НЭ VspD6I индуцирует изгиб ДНК при связывании с участком узнавания. Согласно данному методу было сконструировано 8 фрагментов ДНК **I-A – I-H** одинаковой длины (120 п.н.) с различным местоположением участка узнавания НЭ VspD6I. Известно, что в зависимости от наличия, положения и величины изгиба ДНК, последняя имеет различную электрофоретическую подвижность в геле (*Crothers et al., 1984*). В рамках метода круговых перестановок допускается, что подвижность в геле комплекса ДНК с одним и тем же белком также зависит от конформации ДНК. Таким образом, при связывании НЭ VspD6I с субстратами **I-A – I-H** в случае наличия изгиба ДНК электрофоретическая подвижность соответствующих ДНК-белковых комплексов в полиакриламидном геле (ПААГ) должна быть различной.

На основе относительной подвижности в ПААГ комплексов НЭ VspD6I с дуплексами **I-A – I-H** был определен угол изгиба ДНК, соответствующий $66 \pm 4^\circ$ (рис. 2). Отметим, что в предложенной ранее модели комплекса ЭР VspD6I с ДНК (*Kachalova et al., 2008*) изгиб ДНК не учитывается. В наших экспериментах было показано, что присутствие МС VspD6I не влияло на величину изгиба ДНК, индуцированного связыванием с НЭ VspD6I. Возможно, наличие изгиба ДНК в комплексе с НЭ VspD6I является необходимым фактором для проявления активности МС VspD6I.

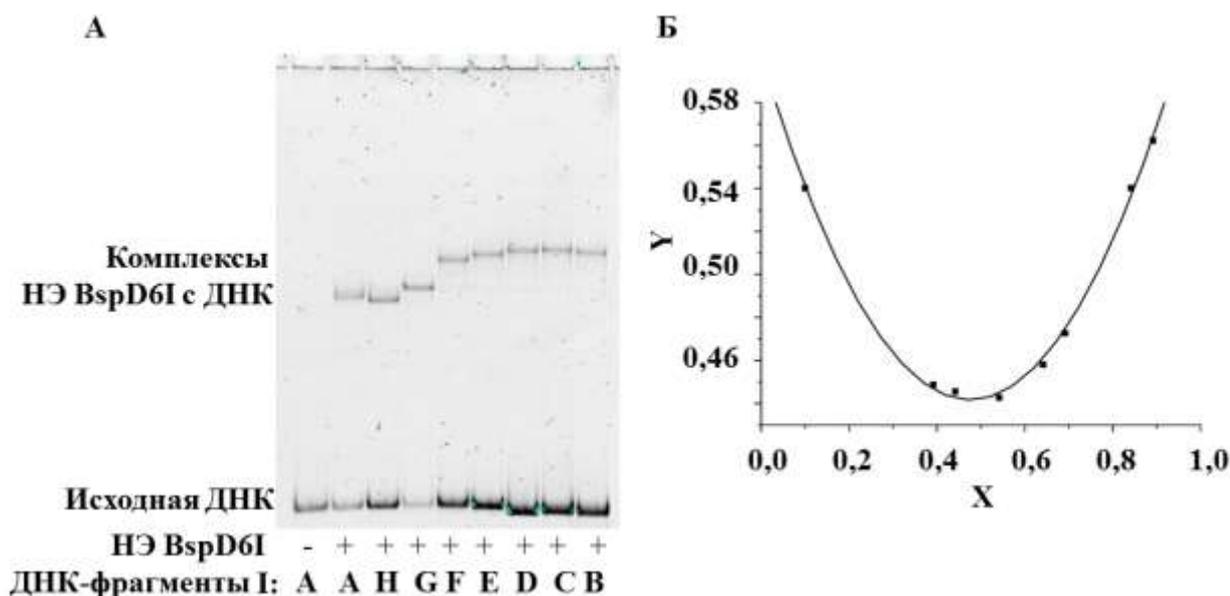
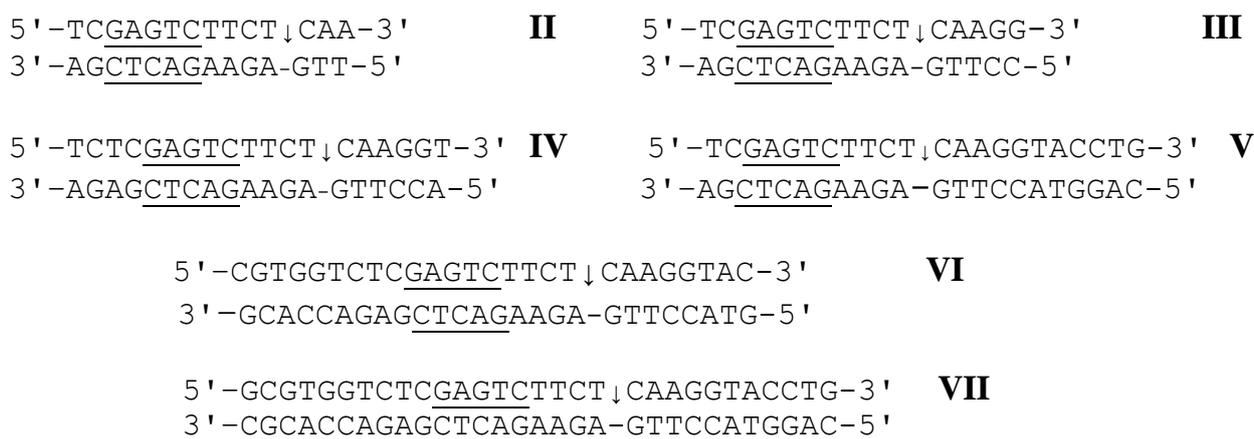


Рис. 2. Определение угла изгиба ДНК в комплексе с НЭ VspD6I. **А)** Комплексообразование НЭ VspD6I со 120-звенными ДНК-фрагментами **I-A – I-H**. Фотография 7%-ного ПААГ после окрашивания раствором SYBR Gold. **Б)** Аппроксимация полученных данных параболической функцией $y = 0,85x^2 - 0,83x + 0,63$; где x – отношение расстояния от центра участка связывания до 5'-конца фрагмента ДНК к полной длине фрагмента, y – отношение подвижностей ДНК в комплексе с белком и свободной ДНК. Угол изгиба ДНК определяли с помощью коэффициентов a , b и c по формуле $a = -b = 2c \times (1 - \cos \alpha)$, где α – угол изгиба ДНК. Эксперимент по комплексообразованию НЭ VspD6I с ДНК-дуплексами проводили независимо 4 раза.

1.2. Влияние длины последовательностей, фланкирующих участок узнавания, на функционирование никующей эндонуклеазы VspD6I

Известно, что длина последовательностей ДНК, фланкирующих участок узнавания, может быть существенной для формирования продуктивного фермент-субстратного комплекса (Pingoud *et al.*, 2005). Были синтезированы ДНК-дуплексы II – VII, содержащие участок узнавания НЭ VspD6I, длина которых составляла 14, 16, 19, 22, 26, 30 п.н., соответственно (↓ указывает позицию гидролиза НЭ VspD6I):



Оптимальная температура для функционирования НЭ VspD6I – 55°C (Железная и др., 2002), однако некоторые использованные ДНК-дуплексы являются достаточно короткими с температурой плавления ($T_{пл}$), близкой к 55°C. Поэтому эффективность взаимодействия НЭ VspD6I с ДНК оценивали при 37°C. Показано, что при этой температуре степень гидролиза всех предложенных ДНК-дуплексов II – VII превышает 80% (рис. 3). Следовательно, для протекания ферментативной реакции достаточно, чтобы фланкирующие последовательности с 5'-конца от участка узнавания составляли 2 п.н., а с 3'-конца от места гидролиза – 3 п.н. Наиболее эффективное связывание НЭ VspD6I с субстратом наблюдалось в случае 26- и 30-звенных ДНК-дуплексов VI и VII (K_d соответствующих комплексов составляли 7 ± 1 нМ и 8 ± 1 нМ, соответственно).

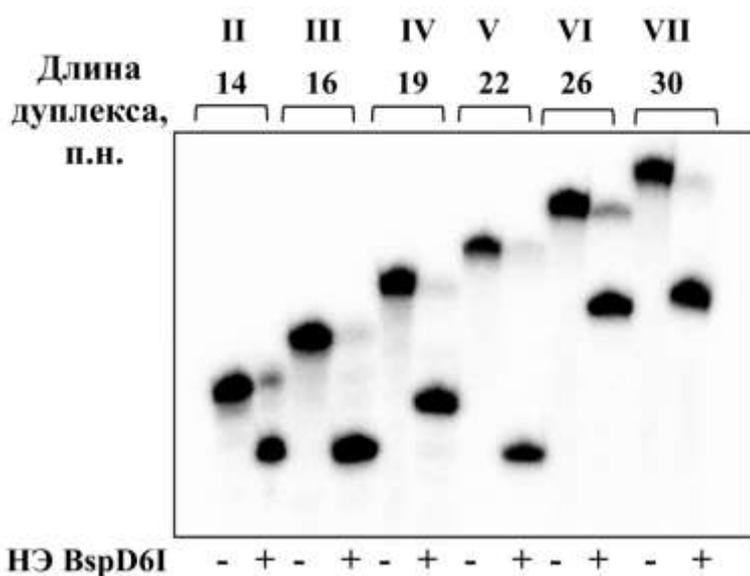
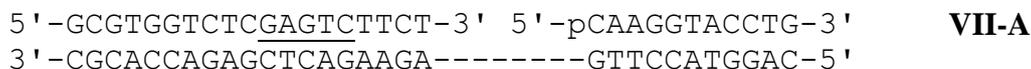


Рис. 3. Гидролиз НЭ VspD6I 5'-³²P-меченных ДНК-дуплексов II – VII. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ, содержащего 7 М мочевины. Каждому ДНК-дуплексу соответствуют две дорожки: контроль (10 нМ исходная ДНК) и результат гидролиза (10 нМ ДНК-дуплекс + 10 нМ НЭ VspD6I).

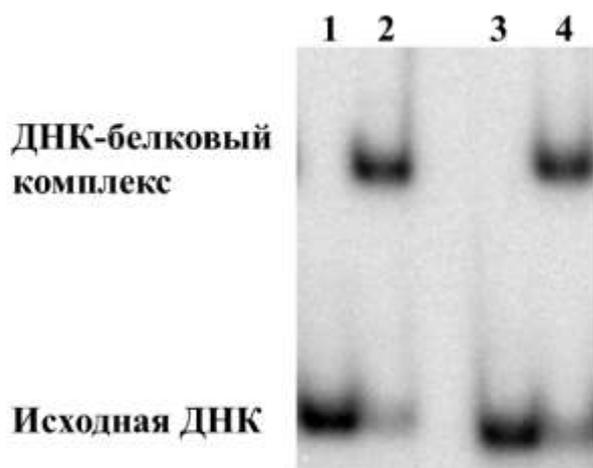
1.3. Взаимодействие НЭ VspD6I с дуплексом, имитирующим продукт гидролиза ДНК-субстрата

Сконструирован 30-звенный ДНК-дуплекс VII-A, в котором отсутствует фосфодиэфирная связь, гидролизуемая ферментом. Дуплекс VII-A имитирует продукт гидролиза 30-звенного дуплекса VII НЭ VspD6I.



Методом «торможения» в геле показано, что НЭ VspD6I образует комплекс с продуктом гидролиза ДНК-субстрата так же эффективно, как и с исходной ДНК. Степени связывания составили около 80% в обоих случаях (рис. 4). Возможно, диссоциация НЭ VspD6I из комплекса с ДНК после гидролиза является лимитирующей стадией этой ферментативной реакции.

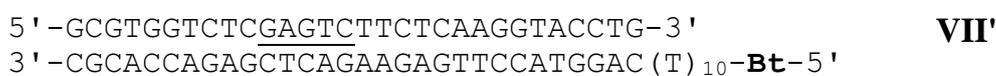
Для детального анализа взаимодействия НЭ VspD6I с продуктом реакции гидролиза ДНК оценивали кинетические параметры процесса методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре. Этот метод позволяет регистрировать связывание белка с поверхностью, на которой иммобилизована ДНК.



Степень связывания, % - 80 - 80

Рис. 4. Анализ связывания НЭ VspD6I с 5'-³²P-меченными ДНК-дуплексами VII (дорожки 1, 2) и VII-A (дорожки 3, 4). Радиоавтограф 7%-ного ПААГ после электрофореза в неденатурирующих условиях. Дорожки 1, 3 – исходная ДНК, дорожки 2, 4 – результат комплексообразования НЭ VspD6I (25 нМ) с ДНК-дуплексом (10 нМ).

На первом этапе на золотом электроде кварцевой пластины проводили иммобилизацию нейтравидина. Затем добавляли 1 мкМ раствор ДНК-дуплекса VII' или VII-A', содержащего на 5'-конце «нижней» цепи биотин (Bt). В «нижнюю» цепь дуплексов были введены дополнительные 10 остатков тимидина для увеличения расстояния между поверхностью сенсора и ДНК. К иммобилизованному на электроде дуплексу добавляли раствор НЭ VspD6I.



Все эксперименты с помощью акустического метода проводили при 25°C. Регистрировали кинетические кривые изменения динамического сопротивления (ΔR_m) и резонансной частоты (Δf_s) после различных модификаций поверхности сенсора. Максимальное изменение резонансной частоты ($-(\Delta f)_{\max}$) после добавления 1 мкМ раствора НЭ VspD6I составляло –200 Гц в случае дуплекса **VII'** и –140 Гц в случае дуплекса **VII-A'** (табл. 1). Константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) рассчитывали согласно подходу, изложенному в работе (*Tasew et al., 2003*). Равновесную константу диссоциации вычисляли как $K_d = k_d/k_a$.

Таблица 1. Параметры связывания НЭ VspD6I с различными ДНК-дуплексами, полученные методом акустической детекции на пьезоэлектрическом сенсоре.

ДНК-дуплекс	$k_a, \text{M}^{-1}\text{c}^{-1}$	k_d, c^{-1}	$K_d, \text{нМ}$	$-(\Delta f)_{\max}, \text{Гц}$
VII'	14300 ± 150	$0,00070 \pm 0,00005$	46 ± 4	200 ± 23
VII-A'	10700 ± 600	$0,00090 \pm 0,00005$	88 ± 11	140 ± 15

Взаимодействие НЭ VspD6I с ДНК-дуплексом **VII'** характеризуется более высокой скоростью образования белково-нуклеинового комплекса по сравнению с дуплексом **VII-A'**, скорости диссоциации комплексов фермента с обоими дуплексами сопоставимы. При этом значение K_d для комплекса НЭ VspD6I с исходным дуплексом **VII'** оказалось лишь в 2 раза ниже, чем значение K_d для комплекса НЭ VspD6I с дуплексом **VII-A'**. Таким образом, данный метод также подтверждает способность НЭ VspD6I образовывать достаточно стабильный комплекс с продуктом собственного гидролиза.

1.4. Функционирование малой субъединицы в составе ЭР VspD6I

Для оценки влияния МС VspD6I на активность НЭ VspD6I был изучен гидролиз 26-звенного ДНК-дуплекса **VI** никующей эндонуклеазой VspD6I в присутствии МС VspD6I в сравнении с его гидролизом свободной НЭ VspD6I. Так как активность МС VspD6I проявляется только в присутствии НЭ VspD6I, оптимальное соотношение субъединиц в составе ЭР VspD6I определяли экспериментальным путем. Показано, что наличие 12-тикратного избытка МС VspD6I относительно НЭ VspD6I в реакционной смеси повышает начальную скорость гидролиза субстрата НЭ VspD6I примерно в 2 раза. Вероятно, НЭ VspD6I быстрее диссоциирует из комплекса с дуплексом, в который внесены разрывы в обе цепи, по сравнению с дуплексом с одноцепочечным разрывом.

Исследован гидролиз «нижней» цепи ДНК-дуплексов **VII** и **VII-A** МС VspD6I. Продемонстрирована способность МС VspD6I гидролизовать «нижнюю» цепь ДНК, когда «верхняя» цепь уже расщеплена (рис. 5). Полученные данные подтверждают способность НЭ VspD6I оставаться в комплексе с ДНК-дуплексом после внесения одноцепочечного разрыва в «верхнюю» цепь. Благодаря этой способности НЭ VspD6I, возможно, координирует гидролиз «нижней» цепи ДНК МС VspD6I.

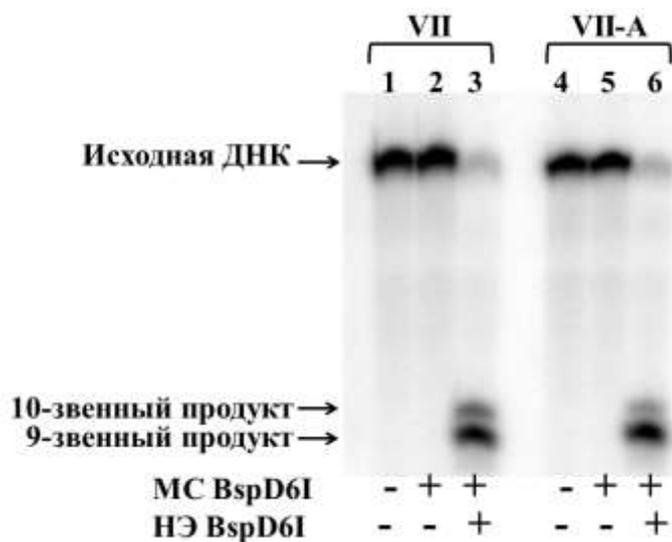


Рис. 5. Анализ продуктов гидролиза ДНК-дуплексов **VII** и **VII-A**, содержащих $5'$ - ^{32}P -метку в «нижней» цепи, MS BspD6I и смесью MS BspD6I с H3 BspD6I. Радиоавтограф 20%-ного ПААГ с 7 М мочевиной. Дорожки 1, 4 – контроли (исходные дуплексы). Дорожки 2, 5 – реакционные смеси, содержащие ДНК и MS BspD6I. Дорожки 3, 6 – реакционные смеси, содержащие ДНК, MS BspD6I и H3 BspD6I. Концентрации ДНК-дуплексов составляли 10 нМ, H3 BspD6I – 10 нМ, MS BspD6I – 120 нМ.

Вероятно, на первом этапе H3 BspD6I связывает ДНК-субстрат и находит участок узнавания. Как показано выше, гидролиз «верхней» и «нижней» цепей субъединицами ЭР BspD6I может происходить одновременно. Образование разрывов в обеих цепях ДНК-дуплекса способствует диссоциации фермент-субстратного комплекса.

1.5. Взаимодействие эндонуклеазы рестрикции BspD6I с азобензолсодержащими ДНК-дуплексами

Известно, что наличие ненуклеозидной вставки в составе ДНК-дуплекса, как правило, приводит к локальному возмущению структуры субстрата в той или иной мере, благодаря чему удается оценить степень значимости возможных ДНК-белковых контактов. Для изучения особенностей взаимодействия ЭР BspD6I с ДНК были сконструированы дуплексы, содержащие ненуклеозидную вставку на основе D-треонинола с азобензольной группой (АБ-вставка, рис. 6).

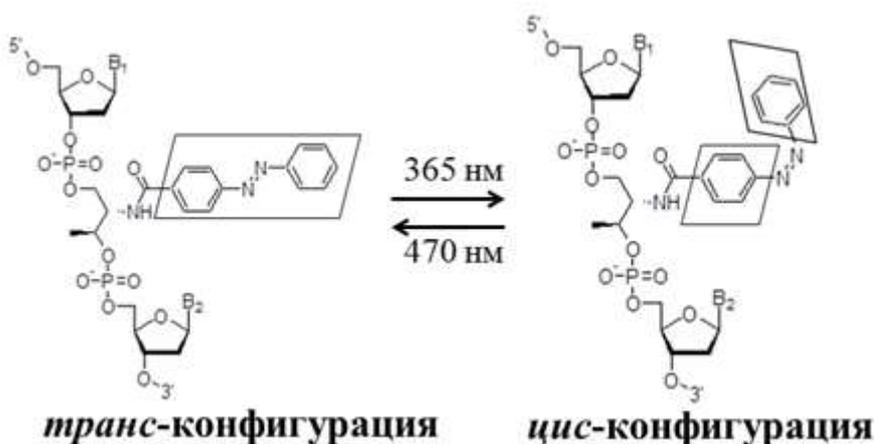


Рис. 6. Ненуклеозидная вставка на основе D-треонинола, содержащая азобензольную группу, в составе олигонуклеотидной цепи. Показана изомеризация остатка азобензола при облучении светом. В₁ и В₂ – гетероциклические основания.

Примечательной особенностью АБ-вставки в составе ДНК-дуплекса является то, что при видимом свете и в условиях проведения реакций, остаток азобензола находится в *транс*-конфигурации, интеркалируя между основаниями нуклеотидов, и стабилизирует

дуплекс за счет включения в межплоскостные («стэкинг») взаимодействия с гетероциклическими основаниями (Asanuma et al., 2003). Облучение модифицированного ДНК-дуплекса УФ-светом позволяет влиять на структуру ДНК: происходит переход азобензола в непланарную *цис*-конфигурацию, нарушение «стэкинг»-взаимодействий и локальная дестабилизация дуплекса (Kashida et al., 2009). Такое свойство АБ-вставки может быть использовано в дальнейшем для влияния с помощью облучения светом на стабильность ДНК-дуплекса и, как следствие, на активность связанного с ним фермента (Asanuma et al., 2007).

Ненуклеозидную АБ-вставку в качестве дополнительного звена вводили как в позиции гидролиза НЭ VspD6I и МС VspD6I, так и в прилегающие участки (рис. 7). На основе 26-звенного субстрата VI были сконструированы ДНК-дуплексы VI-A – VI-F, содержащие только одну АБ-вставку в положениях 2, 4, 6, 2, 5, 6, соответственно (рис. 7), и изучено их взаимодействие с НЭ VspD6I и МС VspD6I при видимом свете (остаток азобензола в *транс*-конфигурации).

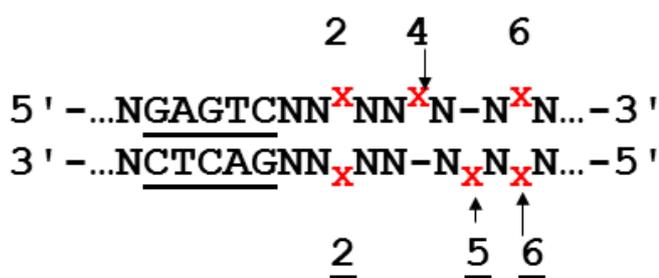


Рис. 7. Схема расположения ненуклеозидной вставки (X) в цепях субстрата, участок узнавания ЭР VspD6I подчеркнут. Стрелки указывают на позиции гидролиза НЭ VspD6I и МС VspD6I, соответственно. Ненуклеозидная вставка вводилась только в один из указанных межнуклеотидных узлов ДНК-дуплекса в качестве дополнительного звена.

Показано, что положение ненуклеозидной вставки практически не сказывается на значении K_d комплекса ДНК с НЭ VspD6I (табл. 2), но существенным образом влияет на начальную скорость гидролиза дуплекса ферментом. Наличие АБ-вставки в положении 2 (дуплекс VI-A) значительно снижает эффективность функционирования НЭ VspD6I. Вероятно, НЭ VspD6I контактирует с углеводофосфатным остовом ДНК в этом участке. Введение модификации в гидролизуемый узел (дуплекс VI-B, положение 4) практически полностью блокирует гидролиз НЭ VspD6I. Таким образом, ДНК-дуплекс VI-B является негидролизуемым аналогом субстрата НЭ VspD6I. Фермент образует с этим дуплексом стабильный комплекс и практически его не расщепляет.

Неожиданным оказался тот факт, что негидролизуемым аналогом субстрата НЭ VspD6I является также дуплекс VI-F, содержащий АБ-вставку в основной позиции гидролиза МС VspD6I. Возможно, НЭ VspD6I образует контакт с углеводофосфатным остовом в этом положении «нижней» цепи ДНК и таким образом координирует расщепление этой цепи субстрата МС VspD6I. Начальная скорость гидролиза дуплексов VI-C, VI-D, VI-E НЭ VspD6I не изменялась или незначительно уменьшалась.

Таблица 2. Параметры взаимодействия НЭ VspD6I и МС VspD6I с 26-звенными ДНК-дуплексами, содержащими АБ-вставку.

ДНК-дуплекс	Последовательность центральной части ДНК-дуплекса (5'-3'/3'-5')	K_d комплекса НЭ VspD6I-ДНК, нМ	Начальная скорость гидролиза ДНК НЭ VspD6I, нМ/мин	Отн. степень гидролиза ДНК НЭ VspD6I, %	Отн. степень гидролиза ДНК МС VspD6I, %
VI	<pre> ↓ ...TCGAGTCTTCTCAAGG... ...AGCTCAGAAAGAGTTCC... ↑↑ </pre>	7 ± 1	$6,2 \pm 0,7$	100	100
VI-A	<pre> ...TCGAGTCTT^xCTCAAGG... ...AGCTCAGAA-GAGTTCC... </pre>	11 ± 2	$0,5 \pm 0,1$	81	77
VI-B	<pre> ...TCGAGTCTTCT^xCAAGG... ...AGCTCAGAAAGA-GTTCC... </pre>	9 ± 2	$0,1 \pm 0,05$	4	11
VI-C	<pre> ...TCGAGTCTTCTCA^xAGG... ...AGCTCAGAAAGAGT-TCC... </pre>	12 ± 2	$3,7 \pm 0,2$	100	86
VI-D	<pre> ...TCGAGTCTT-CTCAAGG... ...AGCTCAGAA^xGAGTTCC... </pre>	15 ± 3	$6,5 \pm 0,8$	100	8
VI-E	<pre> ...TCGAGTCTTCTC-AAAGG... ...AGCTCAGAAAGAG^xTTCC... </pre>	15 ± 3	$5,8 \pm 0,7$	100	11
VI-F	<pre> ...TCGAGTCTTCTCA-AGG... ...AGCTCAGAAAGAGT^xTCC... </pre>	14 ± 3	$0,2 \pm 0,05$	44	28

X – обозначение нунулеозидной вставки. ↓ и ↑ указывают на позиции гидролиза «верхней» и «нижней» цепей, соответственно. Относительную степень гидролиза ДНК определяли при 37°C (30 мин) и рассчитывали как отношение степени гидролиза модифицированного дуплекса к степени гидролиза дуплекса **VI**, умноженное на 100.

Показано, что снижение эффективности гидролиза НЭ VspD6I дуплексов **VI-A**, **VI-B** и **VI-F** (АБ-вставка в основном месте гидролиза МС VspD6I) закономерно приводит к снижению активности МС VspD6I по отношению к этим субстратам. МС VspD6I, так же как и НЭ VspD6I, практически не расщепляет ДНК-дуплекс **VI-B** (АБ-вставка в месте гидролиза НЭ VspD6I). Эффективность гидролиза дуплекса **VI-C** МС VspD6I снижалась незначительно. Интересно, что наличие АБ-вставки в «нижней» цепи вблизи участка узнавания в положении 2 (дуплекс **VI-D**), а также в положении 5 (дуплекс **VI-E**) – неосновное место гидролиза ДНК МС VspD6I – блокирует каталитическую активность МС VspD6I. Таким образом, в реакциях с использованием синтетических ДНК-дуплексов, содержащих АБ-вставку, впервые показано наличие контактов МС VspD6I с ДНК, причем не только с местами гидролиза ДНК в «нижней» цепи, но также и вблизи участка узнавания (положение 2). Данные взаимодействия, по-видимому, играют ключевую роль в функционировании МС VspD6I.

Из табл. 2 видно, что эффективное функционирование НЭ VspD6I является основополагающим фактором для действия МС VspD6I. Однако из анализа полученных данных также следует, что эффективный гидролиз ДНК НЭ VspD6I не всегда является

достаточным условием для функционирования МС VspD6I. Так, наличие АБ-вставки в «нижней» цепи в положениях 2 (дуплекс **VI-D**) или 5 (дуплекс **VI-E**) ингибирует действие МС VspD6I, несмотря на то, что НЭ VspD6I эффективно гидролизует эти дуплексы. Вероятно, для проявления активности МС VspD6I необходимы «правильная» конформация НЭ VspD6I в комплексе с ДНК и способность НЭ VspD6I эффективно гидролизовать «верхнюю» цепь, а также формирование собственных контактов с некоторыми участками в «нижней» цепи ДНК.

1.6. Регулирование активности никующей эндонуклеазы VspD6I с использованием модифицированных ДНК-дуплексов

Идея предложенного нами подхода заключается в использовании негидролизуемого НЭ VspD6I аналога ДНК-субстрата. При больших избытках такого аналога ДНК-связывающий центр НЭ VspD6I будет занят негидролизуемым дуплексом, и целевая (например, геномная) ДНК не сможет подвергнуться расщеплению. Изменение внешних условий (нагревание и/или облучение УФ-светом) должно приводить к дестабилизации дуплекса и, как следствие, диссоциации комплекса эндонуклеазы с синтетическим фрагментом ДНК. В результате фермент сможет связаться с целевой ДНК и гидролизовать её.

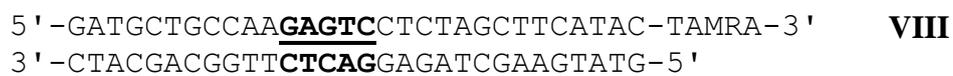
В качестве негидролизуемого аналога субстрата НЭ VspD6I был выбран 30-звенный ДНК-дуплекс **VII**, содержащий в месте гидролиза НЭ VspD6I АБ-вставку (обозначена как **X**). Для снижения стабильности негидролизуемого аналога субстрата в его состав были внесены одноцепочечные разрывы (дуплекс **VII-B**²). Для усиления влияния процесса фотоизомеризации на стабильность дуплекса остаток (остатки) азобензола кроме положения 4 вводили в положение 6 (ДНК-дуплекс **VII-C**), либо в положения 2 и 6 (ДНК-дуплекс **VII-D**) в качестве дополнительных звеньев.



ДНК-дуплексы **VII-B** – **VII-D**, состоящие из пяти олигонуклеотидов, диссоциируют на отдельные олигонуклеотиды в интервале температур от 15 до 40°C. Был подобран избыток ДНК-дуплекса **VII-B**, при котором наблюдалось 95%-ное ингибирование НЭ VspD6I при 25°C. Дальнейшее облучение УФ-светом должно было привести к восстановлению активности фермента.

² В дуплексах **VII-B** – **VII-E** ориентация цепей ДНК как в дуплексе **VII** (см. стр. 8).

Для проверки возможности фоторегуляции активности НЭ VspD6I в присутствии избытка АБ-содержащих ДНК-дуплексов была изучена кинетика гидролиза 30-звенного субстрата VIII ферментом без облучения и при облучении УФ-светом с длиной волны 365 нм.



Реакцию проводили при температурах 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50°C. Однако ни при одной из использованных температур разницы в начальных скоростях гидролиза субстрата VIII в зависимости от облучения не наблюдалось. При этом активность самого фермента не зависела от облучения. Вместе с тем, ярко выраженный эффект изменения активности НЭ VspD6I в присутствии АБ-содержащих дуплексов наблюдался в зависимости от температуры реакции гидролиза. Так, при 25°C в присутствии дуплекса VII-B способность НЭ VspD6I гидролизовать ДНК была практически полностью блокирована. При повышении температуры до 50°C активность фермента восстанавливалась (рис. 8). Для регулирования функционирования НЭ VspD6I с помощью температуры был предложен альтернативный дуплекс-ингибитор VII-E, содержащий остаток триэтиленгликоля (Y) в качестве дополнительного звена в месте гидролиза ферментом. Избыток дуплекса VII-E также почти полностью ингибировал активность НЭ VspD6I при 25–30°C. При повышении температуры до 45°C дуплекс VII-E диссоциировал, освобождая при этом ДНК-связывающий центр фермента.

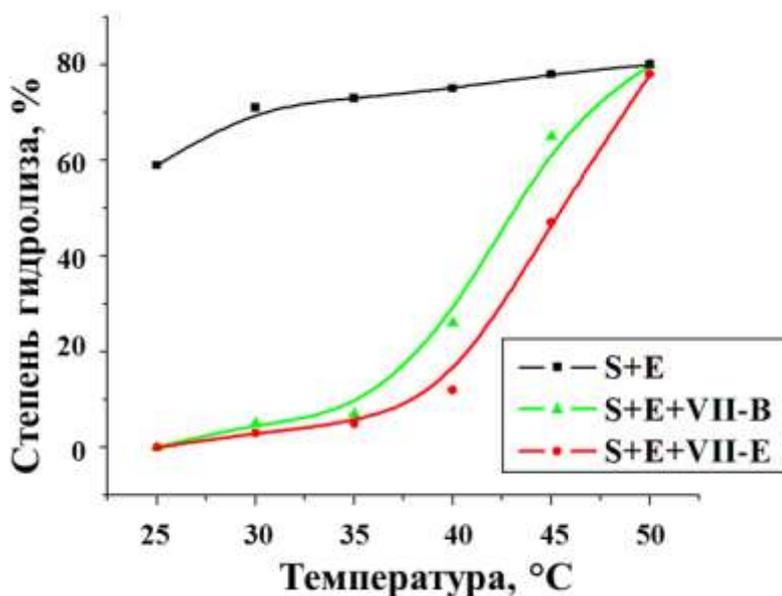
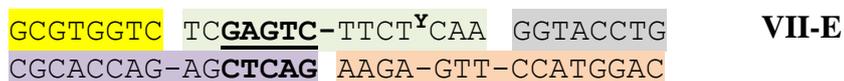


Рис. 8. Зависимость степени гидролиза НЭ VspD6I (E) целевой ДНК VIII (S) в отсутствие ингибиторов (черная кривая) и в присутствии 300-кратного избытка дуплексов VII-E (красная кривая) или VII-B (зеленая кривая). Время инкубации – 5 мин (10 нМ НЭ VspD6I, 10 нМ ДНК-дуплекс VIII, 3 мкМ ДНК-дуплексы VII-E и VII-B).

2. Изучение свойств конъюгатов гомодимерной эндонуклеазы рестрикции SsoII с ДНК-фрагментами

В качестве второго модельного белка была выбрана гомодимерная ЭР SsoII. Она входит в систему Р-М II-го типа бактерии *Shigella sonnei* 47 (Унорова и др., 1985). Белок имеет в своем составе 305 а.о., его молекулярная масса составляет 35,9 кДа. Фермент узнаёт в двутяжевой ДНК последовательность нуклеотидов 5'-↓CCNGG-3'/3'-GGNCC↑-5' (N = А, Т, G или С) и гидролизует ДНК на границах этого участка в местах, указанных стрелками. ЭР SsoII является изошизомером и ближайшим гомологом ЭР Ecl18kI. Для комплекса ЭР Ecl18kI с субстратом имеются данные рентгеноструктурного анализа, которые находятся в полном соответствии с результатами биохимических исследований контактов ЭР SsoII с ДНК (Bochtler et al., 2006; Кубарева, 2007) и, таким образом, могут быть использованы при работе с ЭР SsoII.

Ранее в нашей лаборатории для регулирования активности ДНК-узнающих белков с помощью производных азобензола был предложен метод «молекулярных ворот» (Hien le Thi et al., 2011). Нашей задачей было дальнейшее развитие этого метода – достижение более чем двукратного эффекта фотопереключения активности гомодимерной ЭР SsoII, полученного ранее. В качестве препятствия для проникновения ДНК в активный центр ЭР SsoII нами впервые было предложено использовать фрагменты ДНК, способные формировать дуплекс и содержащие в своем составе нуклеозидную вставку (вставки) на основе D-треонинола с остатком азобензола (схема 1).

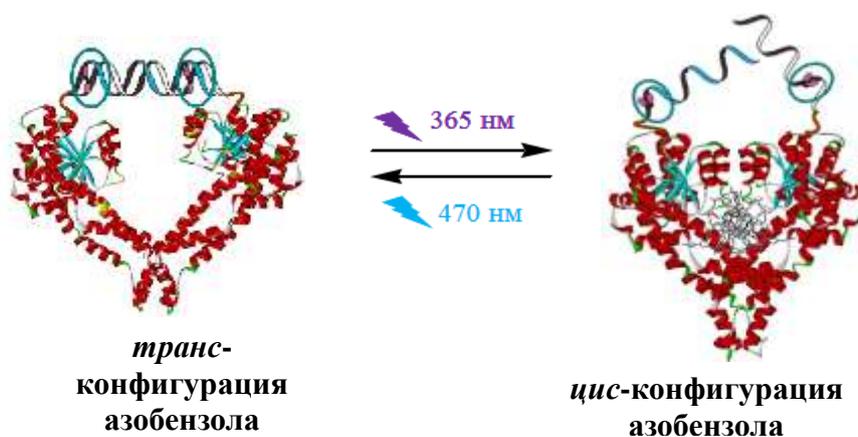


Схема 1.

Образование дуплекса азобензолсодержащими олигонуклеотидами вблизи ДНК-связывающего центра гомодимерной ЭР SsoII должно блокировать действие фермента из-за невозможности субстрата попасть в активный центр. При облучении УФ-светом транс-конфигурация азобензола переходит в цис-конфигурацию, дестабилизируя при этом дуплекс (схема 1). В результате ДНК-субстрат должен проникнуть в ДНК-связывающий центр белка и вступить с ним во взаимодействие.

Для получения ДНК-белковых конъюгатов использовали мутантную форму ЭР SsoII(S171C), содержащую единственный остаток цистеина на мономер фермента, расположенный на поверхности молекулы около ДНК-связывающего центра. Выбор структуры олигонуклеотида для присоединения к белку основывался на следующих требованиях. Во-первых, для модификации двух идентичных субъединиц его нуклеотидная последовательность должна быть самокомплементарной. Во-вторых, олигонуклеотид должен быть достаточно протяженным, чтобы образующийся дуплекс полностью закрывал активный центр фермента и формировался при температуре, когда ЭР SsoII эффективно гидролизует ДНК. В-третьих, ДНК-дуплекс не должен быть слишком прочным, чтобы эффект *цис-транс*-изомеризации азобензола оказывал заметное влияние на его термостабильность. Учитывая перечисленные выше требования, для модификации белка использовали олигонуклеотиды, длиной не менее 10 нуклеотидных звеньев. Синтезированные олигонуклеотиды содержали аминоклипер на 5'-конце для дальнейшего присоединения к белку с помощью бифункционального реагента N-(γ-малеимидо-бутирилокси)сукцинимидного эфира (табл. 3). Выход ДНК-белкового конъюгата в каждом случае составлял примерно 95%.

В качестве ДНК-субстрата для проверки эффекта изменения активности ЭР SsoII в составе конъюгатов с олигонуклеотидами был выбран 30-звенный ДНК-дуплекс **IX**, содержащий в центре единственный участок узнавания фермента.



Таблица 3. Олигонуклеотиды, использованные для ковалентного присоединения к ЭР SsoII(S171C), и соответствующие им дуплексы.

№ олиго- нуклеотида	Дуплекс (5' – 3'/3' – 5')
1	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – CACACGTGTG GTGTGCACAC – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
2	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – CAC ^x ACGT – GTG GTG – TGCA ^x CAC – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
3	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – CACA ^x CAGCTG – TGTG GTGT – GTCGAC ^x ACAC – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
4	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – CA ^x CA ^x CAGCTG – TG – TG GT – GT – GTCGAC ^x AC ^x AC – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
5	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – T ₅ – CAC ^x ACGT – GTG GTG – TGCA ^x CAC – T ₅ – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
6	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – T ₅ – CA ^x CA – CG ^x TG – TG GT – GT ^x GC – AC ^x AC – T ₅ – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
7	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – T ₅ – A ^x CA – CA ^x CG – TG ^x TG – T T – GT ^x GT – GC ^x AC – AC ^x A – T ₅ – p (CH ₂) ₆ – NH ₂
8	NH ₂ – (CH ₂) ₆ p – TTTTTTTTTT

x – остаток N-(4-карбоксиязобензил)-D-треонинола (АБ-вставка),

T₅ – пентатимидиновая последовательность.

Были получены конъюгаты ЭР SsoII(S171C) с азобензолсодержащими олигонуклеотидами № 2 – 7 и изучена их гидролитическая активность по отношению к субстрату **IX** без облучения и при облучении светом длиной волны 365 нм при 37°C. Ни для одного из конъюгатов не наблюдалось разницы в начальных скоростях гидролиза дуплекса **IX** в зависимости от облучения (табл. 4). Вероятно, наличие азобензолсодержащих олигонуклеотидов на поверхности димерного белка вне зависимости от их конформации препятствовало «входу» субстрата в ДНК-связывающий центр. Вместе с тем, было замечено повышение ферментативной активности конъюгатов ЭР SsoII(S171C) с олигонуклеотидами при увеличении температуры реакции (табл. 4).

Таблица 4. Гидролиз ДНК-субстрата **IX** немодифицированной ЭР SsoII(S171C) и конъюгатом фермента с олигонуклеотидом № 2 (ЭР SsoII(S171C)_2).

Фермент, температура реакции	Начальная скорость гидролиза без облучения, нМ/мин	Начальная скорость гидролиза при УФ-облучении ($\lambda=365$ нм), нМ/мин
ЭР SsoII(S171C), 37°C	5,70±0,30	5,60±0,30
ЭР SsoII(S171C)_2, 37°C	0,17±0,04	0,16±0,04
ЭР SsoII(S171C)_2, 45°C	0,33±0,04	0,34±0,04

В связи с этим, нами был получен конъюгат ЭР SsoII(S171C) с 10-звенным олигонуклеотидом №1 (ЭР SsoII(S171C)_1), не содержащим остатков азобензола (табл. 3), и изучена эффективность гидролиза им субстрата **IX** в зависимости от температуры в диапазоне 25–75°C (время инкубации – 30 мин). В контрольных экспериментах исследовали влияние температуры на активность немодифицированного фермента ЭР SsoII(S171C) и конъюгата ЭР SsoII(S171C) с олигонуклеотидом №8 (ЭР SsoII(S171C)_8). Олигонуклеотид №8 содержал десять звеньев Т и амиолинкер на 5'-конце. Таким образом, он не способен формировать какую-либо структуру между двумя субъединицами фермента.

Показано, что немодифицированный фермент эффективно гидролизует субстрат **IX** при 25°C. Наибольшую степень гидролиза под действием ЭР SsoII(S171C) наблюдали при 37–40°C (рис. 9, кривая 1). Присоединение к ЭР как олигонуклеотида №1, так и олигонуклеотида №8 приводило к практически полному блокированию ферментативной активности при 25°C (рис. 9, кривые 2, 3). При повышении температуры реакции от 25 до 45°C эффективность гидролиза субстрата **IX** в присутствии ЭР SsoII(S171C)_8 возрастала. По всей видимости, за счет увеличения флуктуаций олигонуклеотида происходило открытие «входа» в активный центр фермента. При всех тестируемых температурах степень гидролиза субстрата **IX** конъюгатом ЭР SsoII(S171C)_1 оказалась выше, чем

конъюгатом ЭР SsoII(S171C)_8. При 45°C ДНК-белковые конъюгаты проявляли максимальную активность (рис. 9, кривые 2, 3).

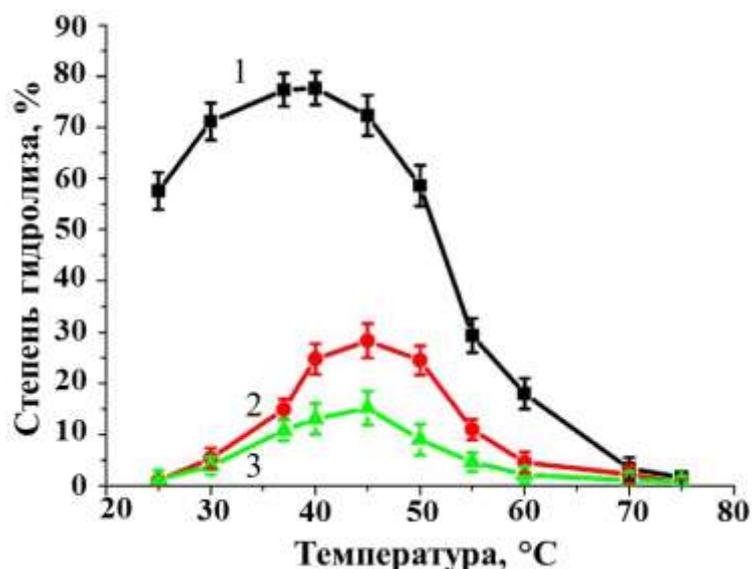


Рис. 9. Температурная зависимость эффективности гидролиза ДНК-субстрата IX (20 нМ) немодифицированным ферментом ЭР SsoII(S171C) (кривая 1, выделена черным цветом) и ДНК-белковыми конъюгатами – ЭР SsoII(S171C)_1 (кривая 2, выделена красным цветом) и ЭР SsoII(S171C)_8 (кривая 3, выделена зеленым цветом). Концентрации всех ферментов составляли 50 нМ (в расчете на димер).

Мы полагаем, что при 45°C происходит не только частичная диссоциация дуплекса, образованного самокомплементарным олигонуклеотидом №1 ($T_{пл} = 54^\circ\text{C}$), но и формирование двух шпилек, которые являются менее значимым стерическим препятствием для проникновения субстрата в активный центр фермента по сравнению с олигонуклеотидом той же длины, но не образующим каких-либо структур (рис. 10).

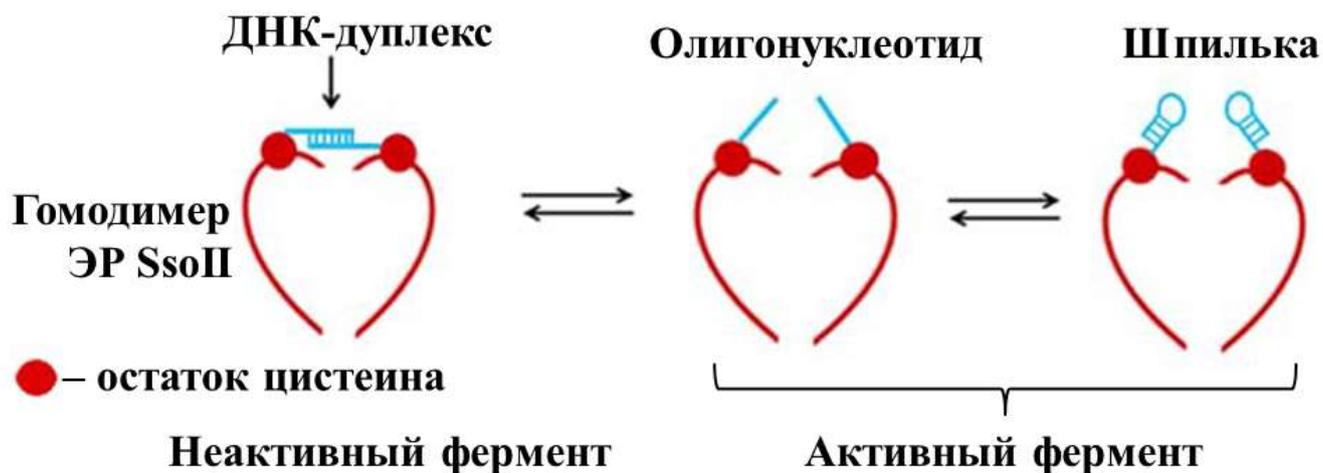


Рис. 10. Схематичное изображение конъюгата ЭР SsoII(S171C)_1 с возможными структурами, образуемыми самокомплементарным олигонуклеотидом №1.

Таким образом, повышение температуры от 25°C позволяет постепенно «включать» активность конъюгатов ЭР SsoII с олигонуклеотидами, приводя к возрастанию начальной скорости гидролиза примерно в 30 раз при 45°C. Активность немодифицированного фермента ЭР SsoII(S171C) также возрастает при нагревании реакционной смеси от 25 до 45°C, но при этом начальная скорость гидролиза субстрата повышается только в 3 раза. Таким образом, нами была показана возможность создания термoperеключаемой гомодимерной ЭР путем ковалентного присоединения олигонуклеотида в определенное положение белковой молекулы. Изменяя длину и последовательность присоединяемого олигонуклеотида, можно регулировать активность фермента в нужной степени в зависимости от температуры.

Изучена возможность обратимого переключения активности ДНК-белковых конъюгатов. Для этого одну и ту же порцию фермента нагревали и охлаждали в течение 30 мин несколько раз, измеряя при этом начальную скорость гидролиза субстрата **IX** (рис. 11).

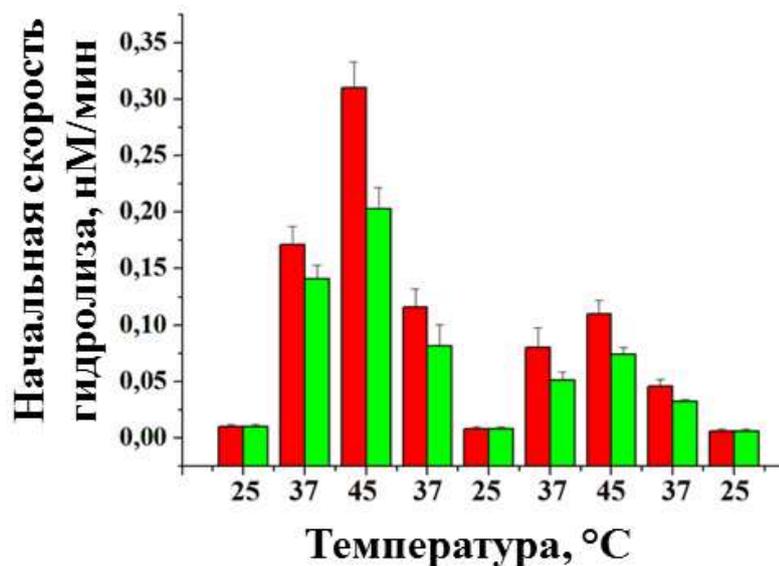


Рис. 11. Сравнение начальных скоростей гидролиза 30-звенного ДНК-дуплекса **IX** в течение двух циклов нагревания-охлаждения ДНК-белковыми конъюгатами ЭР SsoII(S171C)_1 (красные столбики) и ЭР SsoII(S171C)_8 (зеленые столбики).

Показано, что немодифицированный фермент ЭР SsoII(S171C) полностью сохраняет свои свойства на протяжении двух циклов нагревания-охлаждения. Активность ДНК-белковых конъюгатов ЭР SsoII(S171C)_1 и ЭР SsoII(S171C)_8 постепенно снижается, однако общая тенденция изменения ферментативной активности в зависимости от температуры также сохраняется на протяжении двух циклов нагревания-охлаждения. Таким образом, нами предложен подход, который позволяет конструировать белки с явно выраженными термозависимыми свойствами.

ВЫВОДЫ

1. Продemonстрировано влияние большой и малой субъединиц эндонуклеазы рестрикции VspD6I на функционирование друг друга. Показано, что начальная скорость гидролиза ДНК-субстрата большой субъединицей в присутствии малой субъединицы в 2 раза выше. Установлено, что катализ гидролиза двух цепей ДНК эндонуклеазой рестрикции VspD6I происходит, когда обе ее субъединицы находятся в составе одного фермент-субстратного комплекса, вместе с тем малая субъединица может расщеплять ДНК уже после того, как большая субъединица «разрезала» свою цепь.
2. Установлено, что большая субъединица эндонуклеазы рестрикции VspD6I (никующая эндонуклеаза) индуцирует изгиб ДНК при связывании с субстратом. Угол изгиба ДНК составляет $66 \pm 4^\circ$.
3. Впервые обнаружено влияние ненуклеозидной вставки, содержащей остаток азобензола и находящейся в различных положениях ДНК-лиганда, на функционирование эндонуклеазы рестрикции VspD6I. Каталитическая активность большой субъединицы при этом не является единственно необходимым фактором для проявления активности малой субъединицы. Большая субъединица сближена с участками гидролиза ДНК малой субъединицей, обеспечивая её локализацию на ДНК.
4. В качестве ингибиторов активности большой субъединицы эндонуклеазы рестрикции VspD6I при 25°C предложено использовать ДНК-лиганды с модифицированным межнуклеотидным узлом в месте гидролиза и одноцепочечными разрывами. Повышение температуры реакционной смеси до 45°C приводит к диссоциации дуплексов-ингибиторов, высвобождению фермента и восстановлению его активности.
5. Впервые показано, что самокомплементарные олигодезоксирибонуклеотиды, селективно присоединенные к димеру мутантной формы эндонуклеазы рестрикции SsoII в непосредственной близости от его ДНК-связывающего центра, блокируют гидролиз субстрата при 25°C. Продemonстрировано существенное увеличение эффективности гидролиза субстрата ДНК-белковым конъюгатом при повышении температуры. «Включение» и «выключение» активности конъюгата эндонуклеазы рестрикции SsoII с олигодезоксирибонуклеотидом в интервале от 25 до 45°C обратимо и может происходить в течение двух циклов нагревания-охлаждения.

Основные результаты работы изложены в следующих публикациях:

1. Зацепин Т.С., Абросимова Л.А., Монахова М.В., Ле Тхи Хиен, Пингуд А., Кубарева Е.А., Орецкая Т.С. Создание фоторегулируемых биологических молекул на основе производных азобензола. *Успехи химии*, 2013, т. 82, с. 942–963.
2. Abrosimova L.A., Monakhova M.V., Migur A.Y., Wende W., Pingoud A., Kubareva E.A., Oretskaya T.S. Thermo-switchable activity of the restriction endonuclease SsoII achieved by site-directed enzyme modification. *IUBMB Life*, 2013, v.65, p. 1012–1016.

3. Абросимова Л.А., Мигур А.Ю., Кубарева Е.А., Венде В., Железная Л.А., Орецкая Т.С. Разработка ингибиторов никующей эндонуклеазы BspD6I на основе синтетических фрагментов ДНК. *Известия ВУЗов. Прикладная химия и биотехнология*, 2015, т. 13, с. 48–59.
4. Abrosimova L.A., Kubareva E.A., Migur A.Y., Gavshina A.V., Ryazanova A.Y., 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. *Biochim Biophys Acta – Proteins and Proteomics*, 2016, v. 1864, p. 1072–1082.
5. Oretskaya T.S., Le T.H., Schierling B., Monakhova M.V., Abrosimova L.A., Volkov E.M., Romanova E.A., Wende W., Pingoud A., Kubareva E.A. Control the DNA hydrolysis by light. 6th Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, Sept. 4–7, 2011, United Kingdom, Cambridge, p. 109.
6. Abrosimova L., Monakhova M., Schierling B., Volkov E., Romanova E., Wende W., Kubareva E., Oretskaya T., Pingoud A. Construction of photo-switchable restriction endonucleases. 4th GGL Conference on Life Sciences, Sept. 21–22, 2011, Germany, Giessen, p. 88.
7. Abrosimova L., Monakhova M., Schierling B., Volkov E., Romanova E., Wende W., Pingoud A., Kubareva E., Oretskaya T. Light- and termoregulation of the enzymatic DNA hydrolysis. Humboldt Colloquium "The Role of Fundamental Sciences in Society", 31 May – 2 June, 2012, Moscow, p. 106–107.
8. Abrosimova L., Monakhova M., Schierling B., Volkov E., Romanova E., Wende W., Pingoud A., Kubareva E., Oretskaya T. Light-dependent activity of restriction endonucleases. 38th FEBS Congress, July 6–11, 2013, St. Petersburg. p. 1134.
9. Abrosimova L.A., Migur A.Yu., Artyukh R.I., Zheleznaya L.A., Oretskaya T.S., Kubareva E.A. Functional interdependence of two subunits in heterodimeric restriction endonuclease BspD6I. 15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB International Conference, October 21–26, 2014, Taipei, Taiwan, p. 151.
10. Гавшина А.В., Абросимова Л.А. Гетеродимерная эндонуклеаза рестрикции BspD6I: анализ взаимодействия большой и малой субъединиц с модифицированными фрагментами ДНК. Материалы XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", секция «Химия». 13–17 апреля, 2015, Москва, с. 1–2.
11. Абросимова Л.А., Гавшина А.В., Кубарева Е.А., Железная Л.А., Орецкая Т.С. Особенности взаимодействия гетеродимерной эндонуклеазы рестрикции BspD6I с модифицированными фрагментами ДНК. Международная конференция "Химическая биология". 24–28 июля, 2016, Новосибирск, с. 145.