

ISSN 1561-8323 (Print)

ISSN 2524-2431 (Online)

УДК 577.151

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-5-568-575>

Поступило в редакцию 30.06.2021

Received 30.06.2021

**А. Б. Саченко, Я. В. Диченко, А. В. Янцевич, член-корреспондент С. А. Усанов***Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь***ДИЗАЙН СТРУКТУРЫ ХИМЕРНОГО БЕЛКА ДНК-ЭКЗОТРАНСФЕРАЗЫ БЫКА И SSB-БЕЛКА *E. COLI***

**Аннотация.** С целью изучения влияния дополнительного ДНК-связывающего домена SSB-белка *E. coli*, присоединенного к транкированной и нативной ДНК-экзотрансферазе быка, на ДНК-аффинность и стабильность фермента, проведен анализ траекторий молекулярной динамики и пространственных структур гомологичных моделей химерного белка с различными линкерами. Установлено, что более предпочтительным для присоединения SSB-белка является С-концевая последовательность фермента, при этом прогнозируемая стабильность транкированного химерного фермента выше, чем у нативного. Согласно данным молекулярной динамики, введение линкеров между двумя белками для нативной (GGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGS и TCT) и транкированной (GGSGGGSGG, GGGGGG, GTGSGT и 5xGGGGS) формы фермента не только способствует повышению его стабильности, но и увеличивает взаимную подвижность ДНК-аффинных доменов.

**Ключевые слова:** ДНК-экзотрансфераза быка (TdT), EcSSB, молекулярная динамика, химерный фермент, оДНК-связывающий белок (SSB), полипептидные линкеры

**Для цитирования.** Дизайн структуры химерного белка ДНК-экзотрансферазы быка и SSB-белка *E. coli* / А. Б. Саченко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 5. – С. 568–575. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-5-568-575>

**Antos B. Sachanka, Yaraslau U. Dzichenka, Aliaksei V. Yantsevich, Corresponding Member Sergei A. Usanov***Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***DESIGN STRUCTURE OF FUSION PROTEIN OF BOVINE DNA EXOTRANSFERASE AND *E. COLI* SSB PROTEIN**

**Abstract.** The analysis of the trajectories of molecular dynamics simulation and spatial structures of homologous models of fusion protein with various linkers was performed to understand the effect of the additional DNA-binding domain of the *E. coli* SSB protein attached to the truncated and native bovine DNA exotransferase on its stability and activity. It is found that the C-terminus of the enzyme is the preferred end for attachment of the *E. coli* protein, while the stability of the truncated fusion enzyme is higher than the native one. According to molecular dynamics data, introducing linkers between two proteins for the native (GGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGS, and TCT) and truncated (GGSGGGSGG, GGGGGG, GTGSGT, and 5xGGGGS) forms of the enzyme not only improves its stability, but also increases the mutual mobility of DNA-affinity domains.

**Keywords:** bovine DNA exotransferase (TdT), EcSSB, molecular dynamics, fusion enzyme, DNA binding protein (SSB), polypeptide linkers

**For citation.** Sachanka A. B., Dzichenka Y. U., Yantsevich A. V., Usanov S. A. Design structure of fusion protein of bovine DNA exotransferase and *E. coli* SSB protein. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 5, pp. 568–575 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-5-568-575>

**Введение.** ДНК-экзотрансфераза, или терминальная дезоксирибонуклеотидил-трансфераза (TdT) – фермент, который катализирует произвольное добавление нуклеотидов к 3'-концевой последовательности одноцепочечной ДНК, используя дезоксирибонуклеотид-5'-трифосфаты в качестве субстрата [1]. TdT – один из ферментов, обеспечивающих формирование библиотек антител в клетках иммунной системы. В частности, ДНК-экзотрансферазы отвечают за добавление небольшого числа нуклеотидов к неспаренным участкам ДНК во время перестройки гена [2]. TdT может катализировать полимеризацию нескольких сотен [3] или даже тысяч нуклеотидов независимо от природы праймера. TdT используются в молекулярной биологии для мечения 3'-концевых последовательностей ДНК модифицированными нуклеотидами (такими как ddNTP или радиоактивно

меченными нуклеотидами), а также для удлинения праймеров, секвенирования ДНК и в качестве маркера апоптоза [4]. Одним из перспективных направлений является ее использование для диагностики и лечения рака, связанного с ДНК-метилтрансферазой [5]. Помимо полимеризации нуклеотидов в растворе, TdT также может использоваться для синтеза полинуклеотидных щеток *in situ* методом прививки и для синтеза ДНК *de novo* [6]. Одной из ключевых особенностей TdT быка является его высокая активность и возможность экспрессии в клетках *E. coli* с сохранением активности [7]. Кроме того, транкирование TdT (удаление первых 161 N-концевых аминокислотных остатков) способствует существенному повышению активности фермента в растворе, содержащем ионы кобальта (ионы металлов являются неотъемлемой частью активного центра фермента), однако в растворе, содержащем ионы магния, эффективность фермента, наоборот, снижается [8].

Создание белков слияния TdT и ДНК-связывающих белков (SSB) является одним из перспективных способов для повышения активности и термостабильности фермента. Данный подход хорошо себя зарекомендовал при создании химерных полимераз путем слияния их с белками, связывающимися с ДНК семейства *Sulfolobus solfataricus* [9]. С целью рационального дизайна химерного белка (ориентация доменов и последовательность междоменного линкера) проведен структурный анализ ряда вариантов. В качестве ДНК-связывающего белка для слияния использовали белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК из *E. coli* (EcSSB). EcSSB связывается с одноцепочечной ДНК с высокой аффинностью, но с низкой специфичностью к последовательности, что позволяет использовать различного вида, длины и семейства одноцепочечную ДНК в качестве субстратов [10]. К тому же он обладает высокой стабильностью, устойчивостью к тепловой (потеря 10 % активности после кипячения) и щелочной (белок не теряет активность при pH 10,0) денатурации, что так же должно способствовать увеличению стабильности химерного фермента [11].

Цель данной работы – дизайн химерного белка слияния ДНК-экзотрансферазы быка с белком, связывающимся с одноцепочечной ДНК из *E. coli*. Для достижения цели необходимо установить оптимальное взаимное расположение доменов, определить влияние транкирования фермента на его структуру и свойства, а также установить оптимальную длину и аминокислотный состав пептидного линкера между двумя белками исходя из стабильности химерной молекулы по результатам молекулярной динамики. Гипотеза исследования заключается в том, что дополнительный ДНК-связывающий домен, присоединенный к TdT, обеспечит повышение аффинности фермента к одноцепочечной ДНК и положительно скажется на стабильности и активности фермента, а также создаст новые пути управления экзотрансферазной активностью *in vitro*, что имеет особое значения для создания энзиматического программируемого метода *de novo* синтеза ДНК в водных средах.

**Материалы и методы исследования.** Модели химерных ферментов построены методом гомологичного моделирования (комбинацией онлайн сервисов RaptorX, Robetta и программы Modeller 10.0) [12; 13] с использованием пространственных структур TdT мыши и EcSSB, представленных в базе данных Protein Data Bank (идентификаторы в базе данных: 4I27, 2COE, 1QVC) в качестве шаблонов. Аминокислотные последовательности TdT быка и EcSSB получены из базы данных UniProt (идентификаторы в базе данных: P06526, P0AGE0 соответственно), а использованные линкеры выбраны из литературных источников, где они применялись для создания химерных полимераз с участием белков, связывающихся с ДНК [14; 15]. По аналогичной методике построены транкированные модели химерного фермента с удалением первых 161 N-концевых аминокислотных остатков.

Валидацию полученных моделей проводили с помощью программы ChimeraX v 1.2 [16] (визуальная проверка моделей на правильное формирование функциональных доменов и фолдинга белка), а также при помощи онлайн сервиса SWISS-Model Structure Assessment (по карте распределения двугранных углов и показателю QMEAN, описывающему основные геометрические аспекты белковой структуры) [17]. Дальнейшую валидацию моделей проводили с использованием метода молекулярной динамики (МД) в программе AMBER16 в силовом поле Amber (набор параметров ff14).

Модели ферментов подвергали процедуре автоматической подготовки для проведения МД: удаление атомов водородов и молекул воды, добавление ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$ , «растворение» полученной модели в воде.

Перед проведением МД систему подвергали процедуре оптимизации: минимизация полной энергии, включающая в себя 20000 шагов с использованием метода сопряженных градиентов без ограничений на движение атомов. Нагрев осуществляли в течение 100 пс до температуры 350 К (NVT ансамбль). Моделирование свободной динамики проводили в течение 10 нс (NPT ансамбль) при температуре в 300 К и постоянном давлении в 1 атм. Постоянную температуру поддерживали с использованием термостата Ланжевена (частота столкновений –  $2 \text{ пс}^{-1}$ ). Контроль давления в ячейке осуществляли с помощью баростата Берендсена с характерным временем 1,0 пс. Расчет осуществляли в явном растворителе (вода, модель TIP3P, размеры области моделирования –  $5,0 \text{ \AA}$  от поверхности белка).

Компьютерное моделирование осуществляли на вычислительном комплексе ИБОХ НАН Беларуси (2 x Opteron 6378 2,4 GHz (32 ядра); 256 GB RAM; 2 x NVIDIA GeForce GTX TITAN).

Результаты МД анализировали с использованием функционала библиотек Python3: NumPy (численные расчеты), PyTraj (анализ траекторий МД), Matplotlib (графическое отображение).

**Результаты и их обсуждение.** Результаты исследования пространственной структуры TdT с присоединенным по N-концевой последовательности ферментом EcSSB показали, что ДНК-аффинный домен EcSSB не контактирует с ДНК, проходящей через ДНК-аффинный домен фермента и, соответственно, практически не будет изменять аффинность белка к субстрату (рис. 1). Такое расположение EcSSB скорее всего связано с его большим объемом и стерическим влиянием N-концевой последовательности фермента. При исследовании транкированной модели взаимное расположение слитых белков осталось практически без изменений, что позволяет предположить, что объемность белка не дает расположиться ему на месте удаленного N-концевого фрагмента. Вместе с тем нужно отметить, что при таком слиянии возможно увеличение эффективности фермента за счет повышения константы ассоциации ДНК-белка, но в то же время сила взаимодействия EcSSB может оказаться слишком высокой, что в свою очередь приведет к отдалению ДНК от активного центра фермента TdT и снижению его продуктивности при низких концентрациях субстрата.

В случае присоединения EcSSB по C-концевой последовательности фермента, ДНК-аффинные домены окажутся на одной линии (рис. 2), вследствие чего модифицированная ДНК будет плавно переходить с одного ДНК-аффинного домена на другой, что, вероятно, изменит аффинность к одноцепочечной ДНК и положительно скажется на активности фермента. При таком расположении генов ДНК-аффинный домен EcSSB будет действовать как конвейер и способствовать удалению из активного центра TdT модифицированной ДНК и, тем самым, создавать градиент концентрации, который будет содействовать подходу нового субстрата. Также в пользу слияния

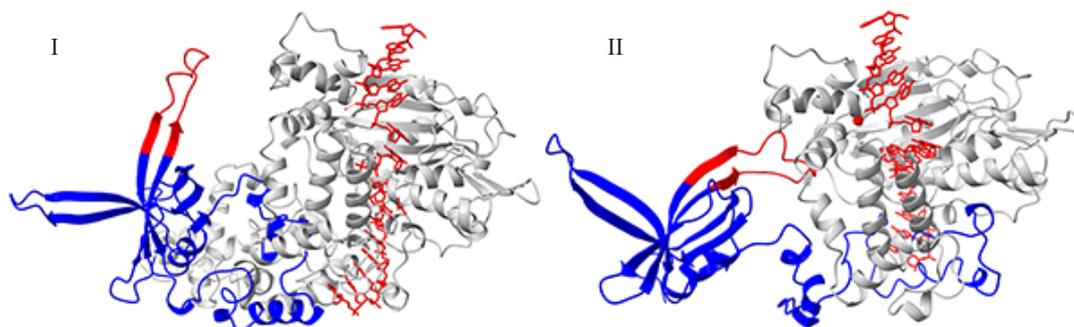


Рис. 1. Модели химерного белка с присоединением EcSSB (серый) по N-концевой последовательности нативного фермента (I, синий), фермента с транкированным N-концевым фрагментом (II), красным цветом выделена ДНК и ДНК-аффинный домен EcSSB

Fig. 1. Models of a fusion protein with EcSSB (gray) attachment at the N-terminus of the native enzyme (I, blue), an enzyme with a truncated N-terminus (II), DNA and DNA-affinity domain of EcSSB are highlighted in red

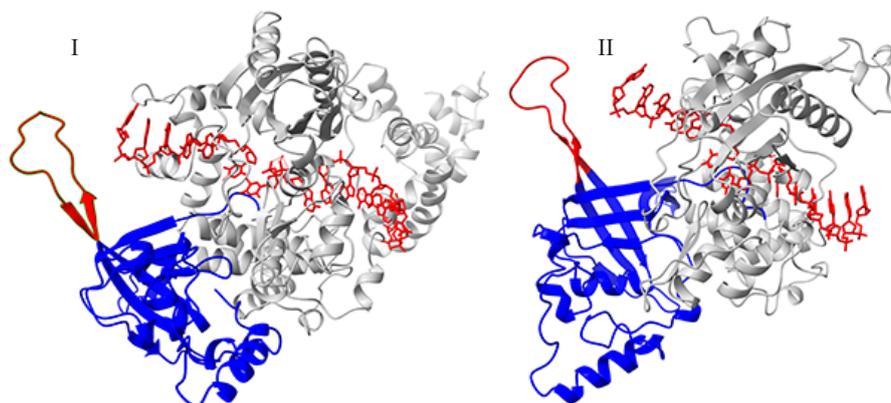


Рис. 2. Модели химерного белка с присоединением EcSSB (серый) по С-концевой последовательности нативного фермента TdT (I, синий) и фермента с транкированным N-концевым фрагментом (II). Красным цветом выделена ДНК и ДНК-аффинный домен EcSSB

Fig. 2. Models of a fusion protein with EcSSB (gray) attachment at the C-terminus of the native TdT enzyme (I, blue), and an enzyme with a truncated N-terminus (II). DNA and DNA affinity domain of EcSSB are highlighted in red

по С-концевой последовательности TdT играет существенное снижение активности EcSSB при мутации С-концевого фрагмента или его удалении, а также участие N-концевого фермента во взаимодействии с ДНК, которое положительно влияет на активность фермента в присутствии ионов некоторых металлов в растворе [8]. При исследовании транкированного и нативного химерного фермента методом МД взаимное расположение ДНК-аффинных доменов практически не изменилось, что говорит об энергетической и стерической выгодности данной пространственной структуры белка.

По результатам МД видно, что транкирование химерного фермента повышает стабильность белка, выход на плато среднеквадратического отклонения (СКО) происходит быстрее, меньше флуктуация радиуса гирации, при этом структура белка имеет больший размер, что может быть связано с увеличением подвижности цепей фермента (рис. 3). Об этом также свидетельствует

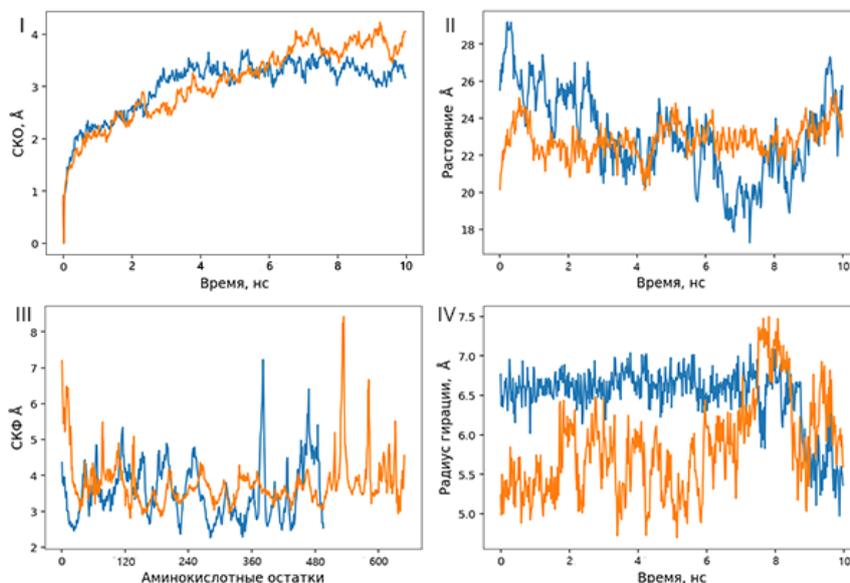


Рис. 3. Результаты расчета среднеквадратического отклонения, относительно начального положения (I), расстояния между ДНК-аффинными доменами (II), среднеквадратичной флуктуации атомов (III) и радиуса гирации (IV), для химерного фермента с присоединенным EcSSB к нативной (оранжевый) и транкированной форме (синий) TdT быка

Fig. 3. Results of calculation of root-mean-square deviation, towards first frame (I), distance between the DNA affinity domains (II), root-mean-square fluctuation of atoms (III), and radius of gyration (IV), for the fusion enzyme of EcSSB attachment to the native (orange) and truncated form (blue) bovine TdT

Результаты молекулярной динамики моделей с линкерами для белка слияния генов нативного и транкрированного фермента TdT быка и EcSSB  
 Results of molecular dynamics of models with linkers for fusion protein of native and truncated enzyme bovine TdT and EcSSB

Линкер Linker	Последовательность линкера Linker sequence	Время, необходимое СКО для выхода на плато, не deviation to reach the plateau, ns		Среднее значение радиуса гирации, Å Average value of the radius of gyration, Å		Среднее расстояние между центрами масс ДНК-аффинных доменов, Å Average distance between the centers of mass of DNA-affinity domains, Å		Среднее изменение количества образованных и разрушенных водородных связей Average change in the number of formed and broken hydrogen bonds	
		ТдТ	Транк. ТдТ	ТдТ	Транк. ТдТ	ТдТ	Транк. ТдТ	ТдТ	Транк. ТдТ
Без линкера	–	–*	2,9 ± 0,3	5,1 ± 0,3	6,5 ± 0,2	23,5 ± 1,2	24,0 ± 2,6	17	23
GSSGVD	GSSGVD	–	2,7 ± 0,6	6,2 ± 0,5	6,6 ± 0,6	22,5 ± 2,6	26,3 ± 2,9	25	22
3xGGGGS	GGGGGGGGGGGGGS	–	2,4 ± 0,3	6,4 ± 0,5	6,6 ± 0,4	23,4 ± 2,4	23,7 ± 3,4	22	20
GGGS GGGS	GGGGGGGS	1,7 ± 0,4	3,4 ± 0,2	5,2 ± 0,9	6,7 ± 0,4	21,8 ± 8,6	22,6 ± 2,8	29	33
ТСТ	TCTGGTGGTTCTCCCAAGAAGAAGAG AAAGTCGGTAGTCCGGATCT	1,3 ± 0,6	2,3 ± 0,5	5,0 ± 0,5	6,4 ± 0,3	14,6 ± 0,8	24,4 ± 2,3	24	25
9xGGGGS	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSG	4,1 ± 1,3	1,4 ± 0,3	4,7 ± 0,5	6,3 ± 0,4	19,8 ± 1,9	22,7 ± 1,8	22	24
GGSGGGsGG	GGSGGGGGGGGGGGGGGS	–	1,1 ± 0,2	5,4 ± 0,6	6,5 ± 0,7	24,6 ± 3,4	27,5 ± 4,6	23	22
3gPrimer	GGGGGGGGGGGGGS	1,7 ± 0,3	3,0 ± 0,3	5,3 ± 0,8	6,8 ± 0,4	23,2 ± 4,9	21,8 ± 4,4	21	25
4xGGGGS	GGGGGGGGGS GGGGGGGGGS	–	1,3 ± 0,3	5,9 ± 1,0	6,9 ± 0,3	25,6 ± 2,2	22,1 ± 2,9	22	18
5xGGGGS	GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGS	–	1,0 ± 0,3	4,8 ± 0,4	6,6 ± 0,6	34,5 ± 0,9	24,2 ± 2,5	20	14
GGGGGG	GGGGGG	–	1,6 ± 0,2	4,6 ± 0,6	6,4 ± 0,6	21,9 ± 2,7	27,6 ± 3,9	26	24
GTGSTG	GTGSTG	нд	4,2 ± 0,2	нд	6,7 ± 0,5	нд	25,4 ± 1,5	нд	21

Примечание. \* – не выход на плато.  
 Note. \* – not reaching a plateau.

характер изменения расстояния между аффинными центрами, среднеквадратичная флуктуация атомов (СКФ) и количество образованных и разрушенных водородных связей. Также необходимо отметить уменьшение расстояния между ДНК-аффинными доменами и увеличение их взаимной подвижности, которое может положительно сказаться на увеличении активности фермента.

По результатам МД нами установлено, что наилучшими показателями стабильности (незначительные колебания СКО, радиуса гирации и изменения количества образованных и разрушенных водородных связей), а также наименьшим радиусом гирации (5,3 Å) вкуче с высокой взаимной подвижностью ДНК-аффинных доменов белков имеют линкеры GGGGSGGGSGGGGS и GGGSGGGGS (таблица). Среди моделей со сниженной подвижностью ДНК-аффинных доменов подобными характеристиками обладает линкер ТСТ, использование которого привело к сближению аффинных доменов, несмотря на его большую длину (в меньшей степени это выражено у линкера 9xGGGS). Вероятно, это связано с образованием вторичной структуры линкера. Обратная ситуация наблюдается у линкера 5xGGGGS: при сопоставимой взаимной подвижности ДНК-аффинных доменов, расстояние между ними наибольшее среди всех исследуемых моделей. Примечательно, что введение линкера, состоящего из 8 аминокислот или больше (кроме 3xGGGGS), между белками приводит к существенному повышению стабильности фермента TdT, а также к увеличению взаимной подвижности ДНК-аффинных доменов и увеличению количества водородных связей, что также положительно сказывается на устойчивости фермента.

Среди моделей, содержащих транкированные белки, наилучшими показателями стабильности и высокой взаимной подвижностью ДНК-аффинных доменов белков обладают линкеры GGSGGGSGG, GGGGGG и, с меньшей подвижностью, линкер 5xGGGGS. Среди ферментов со сниженной взаимной подвижностью ДНК-аффинных доменов подобными характеристиками обладает линкер GTGSTG, что должно способствовать более непрерывному взаимодействию с ДНК. В отличие от нативного белка введение линкеров у транкированного фермента способствует более существенному изменению среднего расстояния между аффинными доменами, но не столь большому взаимному колебанию ДНК-аффинных доменов, при этом использование линкера ТСТ не приводит к их сближению, но существенно ограничивает подвижность. Следует отметить тот факт, что все исследованные модели транкированной формы демонстрируют стабильность на протяжении всего *in silico* анализа, в отличие от моделей нативной формы, которым не всегда удавалось выйти на плато (по результатам расчета СКО) за время исследования либо они разрушались в процессе оптимизации (например, при использовании в качестве линкера GTGSGT). Интересно также, что у разных линкеров транкированного фермента средний радиус гирации практически не изменялся, при этом в большинстве случаев наблюдалось значительное изменение взаимного расстояния между ДНК-аффинными доменами.

**Заключение.** Проведен анализ структур химерных белков TdT быка и EcSSB с различными линкерами. В результате анализа пространственных структур полученных моделей определено, что оптимальным местом для присоединения EcSSB является С-концевая последовательность фермента TdT быка как для нативной, так и для транкированной форм, так как в таком случае будет происходить эффективный переход субстрата с одного ДНК-аффинного домена белка на другой.

Доказано, что транкирование химерного фермента, как и введение пептидных линкеров с длиной более восьми аминокислотных остатков повышает стабильность белка и существенно влияет на изменение взаимной подвижности и расстояния между ДНК-аффинными доменами. В то же время найдены оптимальные гибкие линкеры, GGGGSGGGSGGGGS, GGGSGGGGS и ТСТ для нативного фермента и GGSGGGSGG, GGGGGG, GTGSGT и 5xGGGGS для транкированного, которые не только повышают стабильность фермента, но и изменяют взаимную подвижность ДНК-аффинных доменов.

Полученные результаты будут использованы для дизайна и гетерологической экспрессии химерного белка путем объединения генов TdT быка и EcSSB.

**Благодарности.** Работа выполнена при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований X21M-056 и задания 20210422 Государственной программы научных исследований «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биоорхимия» на 2021–2025 годы.

**Acknowledgments.** The work is carried out with the support of the grant of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research X21M-056 and the task 20210422 of the State Program of Scientific Research “Chemical processes, reagents and technologies, bioregulators and bioorgchemistry” for 2021–2025.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Fowler, J. D. Biochemical, Structural, and Physiological Characterization of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase / J. D. Fowler, Z. Suo // *Chem. Rev.* – 2006. – Vol. 106, N 6. – P. 2092–2110. <https://doi.org/10.1021/cr040445w>
2. Motea, E. A. Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymerase / E. A. Motea, A. J. Berdis // *Biochim. Biophys. Acta Prot. Proteom.* – 2010. – Vol. 1804, N 5. – P. 1151–1166. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.06.030>
3. High-Molecular-Weight Polynucleotides by Transferase-Catalyzed Living Chain-Growth Polycondensation / L. Tang [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2017. – Vol. 56, N 24. – P. 6778–6782. <https://doi.org/10.1002/anie.201700991>
4. Gavrieli, Y. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation / Y. Gavrieli, Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson // *J. Cell Biol.* – 1992. – Vol. 119, N 3. – P. 493–501. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>
5. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Rolling Circle Amplification Induced G-triplex Formation: A Label-free Fluorescent Strategy for DNA Methyltransferase Activity Assay / H. Que [et al.] // *Sens. Act. B: Chem.* – 2019. – Vol. 291. – P. 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.091>
6. Enzymatic fabrication of DNA nanostructures: Extension of a self-assembled oligonucleotide monolayer on gold arrays / D. C. Chow [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127, N 41. – P. 14122–14123. <https://doi.org/10.1021/ja052491z>
7. Generation of Active Bovine Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) in *E. coli* / W. J. Kuan [et al.] // *Biochem. Ins.* – 2010. – Vol. 3. – P. 41–46. <https://doi.org/10.4137/bci.s5123>
8. Expression and Processing of Recombinant Human Terminal Transferase in Baculovirus System / L. M. Chang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 263, N 25. – P. 12509–12513. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37784-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37784-6)
9. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro* / Y. Wang [et al.] // *Nuc. Acids Res.* – 2004. – Vol. 32, N 3. – P. 1197–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
10. Flynn, R. L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians / R. L. Flynn, L. Zou // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 2010. – Vol. 45, N 4. – P. 266–275. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.488216>
11. Weiner, J. H. The deoxyribonucleic acid unwinding protein of *Escherichia coli*. Properties and functions in replication / J. H. Weiner, L. L. Bertsch, A. Kornberg // *J. Biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250, N 6. – P. 1972–1980. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)41671-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41671-2)
12. Kim, D. E. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server / D. E. Kim, D. Chivian, D. Baker // *Nuc. Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. 526–531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
13. Accurate De Novo Prediction of Protein Contact Map by Ultra-Deep Learning Model / S. Wang [et al.] // *PLoS Comp. Biol.* – 2017. – Vol. 13, N 1. – P. 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005324>
14. Sun, S. Structure and enzymatic properties of a chimeric bacteriophage RB69 DNA polymerase and single-stranded DNA binding protein with increased processivity / S. Sun, L. Geng, Y. Shamoo // *Prot. Struct. Func. Bioinf.* – 2006. – Vol. 65, N 1. – P. 231–238. <https://doi.org/10.1002/prot.21088>
15. Chisty, L. T. Fluorescent single-stranded DNA-binding protein from *Plasmodium falciparum* as a biosensor for single-stranded DNA / L. T. Chisty, D. Quaglia, M. R. Webb // *PLOSE ONE.* – 2018. – Vol. 13, N 2. – P. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193272>
16. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers / E. F. Pettersen [et al.] // *Protein Sci.* – 2021. – Vol. 30, N 1. – P. 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
17. Benkert, P. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models / P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede // *Bioinf.* – 2011. – Vol. 27, N 3. – P. 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

### References

1. Fowler J. D., Suo Z. Biochemical, Structural, and Physiological Characterization of Terminal Deoxynucleotidyl Transferase. *Chemical Reviews*, 2006, vol. 106, no. 6, pp. 2092–2110. <https://doi.org/10.1021/cr040445w>
2. Motea E. A., Berdis A. J. Terminal deoxynucleotidyl transferase: The story of a misguided DNA polymerase. *Biochimica et Biophysica Acta – Proteins and Proteomics*, 2010, vol. 1804, no. 5, pp. 1151–1166. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.06.030>
3. Tang L., Navarro L. A., Chilkoti A., Zauscher S. High-Molecular-Weight Polynucleotides by Transferase-Catalyzed Living Chain-Growth Polycondensation. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, vol. 56, no. 24, pp. 6778–6782. <https://doi.org/10.1002/anie.201700991>
4. Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 1992, vol. 119, no. 3, pp. 493–501. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>
5. Que H., Yan X., Guo B., Ma H., Wang T., Liu P., Gan X., Yan Y. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase and Rolling Circle Amplification Induced G-triplex Formation: A Label-free Fluorescent Strategy for DNA Methyltransferase Activity Assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, vol. 291, pp. 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.091>

6. Chow D. C., Lee W. K., Zauscher S., Chilkoti A. Enzymatic fabrication of DNA nanostructures: Extension of a self-assembled oligonucleotide monolayer on gold arrays. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, vol. 127, no. 41, pp. 14122–14123. <https://doi.org/10.1021/ja052491z>
7. Kuan W. J., Joy J., Mee N. F., Perlyn K. Z., Wen T. S., Nguen T., James J., Chai E., Flotow H., Crasta S., Chua K., Peng N. S., Hill J. Generation of Active Bovine Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) in *E. coli*. *Biochemistry Insights*, 2010, vol. 3, pp. 41–46. <https://doi.org/10.4137/bci.s5123>
8. Chang L. M., Rafter E., Rusquet-Valerius R., Peterson R. C., White S. T., Bollum F. J. Expression and Processing of Recombinant Human Terminal Transferase in Baculovirus System. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 263, no. 25, pp. 12509–12513. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)37784-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)37784-6)
9. Wang Y., Prosen D. E., Mei L., Sullivan J. C., Finney M., Vander Horn P. B. A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, no. 3, pp. 1197–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
10. Flynn R. L., Zou L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, vol. 45, no. 4, pp. 266–275. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.488216>
11. Weiner J. H., Bertsch L. L., Kornberg A. The deoxyribonucleic acid unwinding protein of *Escherichia coli*. Properties and functions in replication. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, vol. 250, no. 6, pp. 1972–1980. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)41671-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41671-2)
12. Kim D. E., Chivian D., Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 2004, vol. 32, pp. 526–531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>
13. Wang S., Sun S., Li Z., Zhang R., Xu J. Accurate *De Novo* Prediction of Protein Contact Map by Ultra-Deep Learning Model. *PLoS Computational Biology*, 2017, vol. 13, no. 1, pp. 1–34. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005324>
14. Sun S., Geng L., Shamoo Y. Structure and enzymatic properties of a chimeric bacteriophage RB69 DNA polymerase and single-stranded DNA binding protein with increased processivity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, vol. 65, no. 1, pp. 231–238. <https://doi.org/10.1002/prot.21088>
15. Chisty L. T., Quaglia D., Webb M. R. Fluorescent single-stranded DNA-binding protein from *Plasmodium falciparum* as a biosensor for single-stranded DNA. *PLoS ONE*, 2018, vol. 13, no. 2, pp. 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193272>
16. Petersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Meng E. C., Couch G. S., Croll T. I., Morris J. H., Ferrin T. E. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sciences*, 2021, vol. 30, no. 1, pp. 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
17. Benkert P., Biasini M., Schwede M. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 2011, vol. 27, no. 3, pp. 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

### Информация об авторах

*Саченко Антон Борисович* – мл. науч. сотрудник, аспирант. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: antosuk@yandex.ru.

*Диченко Ярослав Владимирович* – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dichenko@iboch.by.

*Янтсевич Алексей Викторович* – канд. хим. наук, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: a.yantsevich@gmail.com.

*Усанов Сергей Александрович* – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by.

### Information about the authors

*Sachanka Antos B.* – Junior researcher, Postgraduate student. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antosuk@yandex.ru.

*Dzichenka Yaraslau U.* – Ph. D. (Chemistry), Senior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dichenko@iboch.by.

*Yantsevich Aliaksei V.* – Ph. D. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: a.yantsevich@gmail.com.

*Usanov Sergei A.* – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by.