

УДК 577.3

ПОРООБРАЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА ХЕЛИКАЗЫ SsoHel308 ИЗ *SACCHAROLOBUS SOLFATARICUS*

© 2020 г. А.В. Сиунов*, М.П. Борисова**, Ж.И. Андреева-Ковалевская*, А.С. Нагель*,
А.С. Колесников*, А.К. Сурин***, ****, А.С. Солонин*

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина – обособленное подразделение ФИЦ
«Пушчинский научный центр биологических исследований РАН, 142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 5

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

***Филиал Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 6

****Институт белка РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 4

E-mail: solonin@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 26.08.2020 г.

После доработки 26.08.2020 г.

Принята к публикации 23.09.2020 г.

Впервые продемонстрирована порообразующая активность хеликазы SsoHel308 из экстремальной термофильной археи *Saccharolobus solfataricus*. Этот белок способен при встраивании в мембраны эритроцитов кролика обеспечивать их гемолиз. Показано, что данный фермент образует поры в плоской искусственной бислойной мембране и является мембранным трансформером. Встраиваясь в бислойные липидные мембраны, он вызывает изменение их проводимости. Суммируя полученные результаты, мы приходим к выводу, что хеликаза SsoHel308 способна образовывать поры в искусственных бислойных мембранах и в некоторых случаях ток, протекающий через мембраны, имеет особенности, характерные для работы ионных каналов. Короткое время существования пор на мембране значительно снижает токсичность хеликазы для живой клетки, а возможность направленной транслокации однострессовой ДНК в присутствии АТФ позволит в будущем использовать этот фермент в качестве молекулярного шприца для инъекций однострессовых ДНК в живые клетки.

Ключевые слова: хеликаза, экстратермофильные археи, гемолиз, искусственные бислойные мембраны, порообразование.

DOI: 10.31857/S0006302920060022

В последние годы внимание исследователей направлено на создание и развитие нанопоровых технологии, позволяющей прочитывать длинные последовательности ДНК и РНК с определением не только последовательности нуклеотидов, но и их модификаций [1, 2]. По этой технологии с помощью встроенных в белковую пору датчиков определяют последовательность нуклеотидов однострессовой полинуклеотидной цепи при ее прохождении через поры, сформированные в искусственной бислойной мембране. Перемещение ДНК через природные нанопоры управляется внешней силой, например приложенным электрическим напряжением, в связи с этим функции нанопор в первую очередь изучали *in vitro*. Ограничения использования этой технологии определяются, во-первых, необходимостью пропускать

через пору однострессовые последовательности, во-вторых, слишком высокой скоростью прохождения полинуклеотидных нитей через пору, что в значительной степени повышает ошибки в определяемых последовательностях, в-третьих, сложностью самой природной части технологии, включающей различные белковые продукты. Частично эти ограничения снимаются за счет использования фермента хеликазы, который не только расплетает двустрессовую ДНК, но и значительно замедляет прохождение ДНК через отверстие, сформированное гексамерной формой этого белка, благодаря зависимой от АТФ транслокации однострессовой ДНК [3]. Практически все белки нуклеинового обмена, к которым также относятся хеликазы, функционируют на мембранах. Возможность совместимости мутантной хе-

ликазы вируса папилломы крупного рогатого скота (BPV E1) [4, 5], относящейся к SFIII-семейству хеликаз [6], с мембранами ранее была изучена на липосомных везикулах с использованием криоэлектронной микроскопии [7].

В настоящей работе мы продемонстрировали, что хеликаза экстремальной термофильной археи *Saccharolobus solfataricus* [8], встраиваясь в мембрану эритроцитов, обеспечивает их гемолиз. В то же время этот фермент способен образовывать поры в плоской искусственной бислойной мембране, свойства которых позволяют предположить их возможное потенциальное использование в нанопоровой технологии определения последовательностей ДНК и РНК.

5' CTTTATTTTCAGGGCCATATGGGTTTAGAATTAGAGTG 3' – прямой,
5' GCCGGATCCCTCGAGTTAATGAAATCTATTAAGTAATC 3' – обратный.

Аликвоты реакционной смеси анализировали на наличие фрагментов соответствующего размера электрофоретически в 1%-м агарозном геле. Полученные фрагменты ДНК были очищены при помощи QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, США). Безлигазное клонирование в ДНК pET19-mod проводили при 42°C в течение 30 мин с использованием фрагмента NdeI-XhoI вектора и ПЦР-фрагментов геномной ДНК по схеме, разработанной фирмой Clontech Laboratories Inc.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клонирование гена *hel308*. Для создания продуцента хеликазы на основе клеток *E. coli* целевой ген *ssohel308* из геномной ДНК *Saccharolobus solfataricus* был клонирован в векторную плазмиду pET19mod [9]. Выбор рестрикционных сайтов, по которым будет осуществляться клонирование, проводили с помощью программы SnapGene. Вследствие штаммовых различий ген мог содержать сайты для любых эндонуклеаз рестрикции, используемых при клонировании, поэтому была применена тактика безлигазного клонирования. Отбор фрагментов ДНК, содержащих ген *ssohel308*, осуществляли с использованием следующих синтетических праймеров:

(США) к набору реагентов для клонирования ДНК Fusion™ CF Dry-Down PCR Cloning Kit (в молярном соотношении 2 : 1). Скрининг клонов трансформированных клеток *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США) на наличие плазмид со вставками нужного размера проводили методом ПЦР с колоний с помощью ДНК-полимеразы TaqSE (фирмы СибЭнзим) и универсальных праймеров для векторов серии pET – T7P и T7T:

T7P: 5' TAATACGACTCACTATAGG 3' – прямой,
T7T: 5' AAGGGGTTATGCTAGTTA 3' – обратный.

Последовательность клонированного гена сравнили с базой данных EMBL (ген депонирован под номером AM778123) [8]. Рекомбинантные плазмиды, содержащие ген *ssohel308*, полностью совпадающий по последовательности нуклеотидов, трансформировали в экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagene, США). Для экспрессии использовали рекомбинантный ген *ssohel308*, содержащий сайт, узнаваемый Tев-протеазой, и шесть гистидиновых остатков на N-конце. Клон, содержащий ген *ssohel308*, использовали для получения биомассы конечного продукта при выращивании в 10-литровом ферментере в объеме 6 л при pH 7.0 и 37°C. При достижении культурой плотности 1.9 (оптическая плотность при длине волны 595 нм) для индукции синтеза SsoHel308 вносили изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид до конечной концентрации 1 мМ (0.8 г) и выращивали в течение 7 ч в условиях ин-

тенсивной аэрации и температуре 37°C. На 6 л среды было получено 90 г сырого веса биомассы, которую использовали для выделения и очистки хеликазы SsoHel308.

Очистка хеликазы SsoHel308. 15 г индуцированных клеток *E. coli* BL21(DE3) с геном *ssohel308*, содержащих 8.15 г белка, суспендировали в 6 мл буфера А, обработанного фенолметилсульфонил фторидом (50 мМ Na₂PO₄, pH 7.4, 300 мМ NaCl), заморозили при –20°C и разрушили с помощью Френч-пресса. Для эффективной экстракции белков и деградации нуклеиновых кислот полученный лизат озвучивали во льду на ультразвуковом дезинтеграторе MSPE в режиме 15 циклов по 30 с с минутными перерывами, осветляли центрифугированием (9000 g, 30 мин), фильтровали через 0.22 мкм фильтр (типе GS, Millipore, США) и разбавляли буфером А до 200 мл. Полученный препарат с концентрацией белка

40.49 мг/мл наносили на уравновешенные буфером А спаренные колонки (с целлюлозой ДЕ-52 (Whatman, США) объемом 50 мл и Ni-NTA-агарозой (Qiagen, США) объемом 10 мл. После нанесения препарата предколонку с целлюлозой ДЕ-52 удалили, колонку с Ni-NTA-агарозой промыли 20 объемами буфера Б (50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.4, 500 мМ NaCl, 25 мМ имидазола). Белок элюировали градиентом имидазола от 50 мМ до 1 М в буфере Б. Собирали фракции по 5 мл. Объединенные пиковые фракции диализовали против буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl, pH 7.5 и 10 мМ NaCl (буфер В) и нанесли на уравновешенную этим же буфером 50 мл колонку с ДЭАЭ-сефарозой (DEAE Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Швеция), затем промыли 10 объемами буфера В и трижды по 50 мл растворами, содержащими соответственно 0.1, 0.2 и 0.3 М NaCl в буфере В. Белки элюировали градиентом NaCl от 0.3 до 1.25 М в том же буфере в объеме 90 мл, фракции тестировали электрофоретически. Полученный препарат диализовали против буфера В и использовали в экспериментах по анализу порообразования. Для хранения при -20°C препарат фермента диализовали против 50% глицерина в буфере В.

Хромато–масс-спектрометрический анализ. Полосы белков, полученных при электрофорезе выделенных препаратов хеликазы, анализировали с помощью тандемной масс-спектрометрии, как описано в работе [10]. Для этого участки гелей, содержащие белки, вырезали и обрабатывали протеиназой К. Затем полученные пептиды разделяли с помощью высокоэффективной нанопотоковой жидкостной хроматографии в обращенной фазе (Easy nLC 1000, Thermo Fisher Scientific, США), совмещенной с масс-спектрометрией высокого разрешения (Orbitrap Elite, Thermo Fisher Scientific, Германия). Масс-спектрометрический анализ проводили при разрешении 60000 для панорамных масс-спектров ионов пептидов и 15000 для спектров фрагментации ионов, активированной соударениями с инертным газом.

Гемолитическая активность. Проведение реакции по определению гемолитической активности было описано ранее в работе [11]. В данной работе использовали эритроциты кролика и процедуру, основанную на измерении концентрации гемоглобина, высвобождаемого при лизисе эритроцитов. Эритроциты кролика промывали 74 мМ Na-фосфатным буфером (pH 6.8), содержащим 74 мМ NaCl, и доводили до концентрации 2% (об/об). Конечная концентрация хеликазы в пробе составила 0.15 мг/мл. Для контроля спонтанного гемолиза эритроцитов добавляли физиологический раствор. Полный лизис достигали осмотическим шоком при добавлении в реакционную среду ди-

стиллированной воды. В качестве контрольных образцов использовали значения спонтанного и полного лизиса эритроцитов. Степень лизиса определяли согласно следующему уравнению:

$$E = (A_e - A_0)/(A_{100} - A_0) \times 100, \quad (1)$$

где A_e , A_0 и A_{100} – обратные величины оптической плотности при 595 нм для образца и контролей спонтанного и полного лизиса соответственно.

Реакцию гемолиза проводили в объеме 100 мкл в течение 12 ч на планшетном ридере Microplate Reader FilterMax F5 (Molecular Devices, США) с постоянным помешиванием при 30°C , показания снимали каждые 10 мин на длине волны 595 нм.

Бислойные липидные мембраны. Мембраны на-слаивали по методу Мюллера–Рудина [12]. Для формирования мембран использовали соевый лецитин в концентрации 20 г/л (L- α -phosphatidylcholine Type IV-S, Sigma, США). Окружающий раствор содержал 1 М KCl и 5 мМ трис-HCl (Sigma, США), pH 7.3. Все эксперименты проводили в условиях клемпа напряжения. *Trans*-отделение было связано с виртуальной землей через усилитель Keithle 301 (Keithle, США) в конфигурации «ток–напряжение». Мембранный потенциал поддерживали через Ag/AgCl-электроды в 3 М KCl и агаровые мостики. Регистрацию тока вели с использованием платы ЦАП/АЦП DT2801A (Data Translation, США) и специализированной программы «БЛМ», разработанной А.Я. Зильберштейном (личное сообщение). Исследуемый агент всегда вносили в отсек камеры, где находился измерительный электрод. Знак потенциала на рисунках указан для *trans*-отделения. Все измерения проводили при комнатной температуре ($22-23^{\circ}\text{C}$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Очистка хеликазы SsoHel308. Схема очистки хеликазы SsoHel308 представлена на рис. 1а. После прохождения препарата фермента через колонку с целлюлозой ДЕ-52 и хроматографии на отделенной колонке с Ni-NTA-агарозой пиковые фракции элюировали при концентрации имидазола от 340 до 420 мМ. Концентрация белка в пиковой фракции составила 0.9 мг/мл. Объединенные фракции общим объемом 18 мл с концентрацией 2.2 мг/мл, содержащие хеликазу, диализовали против буфера В. Затем провели хроматографию на 50 мл колонке с ДЭАЭ-сефарозой ФФ и фракции, элюированные при концентрации NaCl от 0.55 до 0.75 М в буфере В, содержащие хеликазу, объединили и диализовали против буфера В. Фракции на всех этапах очистки тестировали электрофоретически (рис. 1б). Выход очищенного белка из 15 г сырого веса рекомбинант-

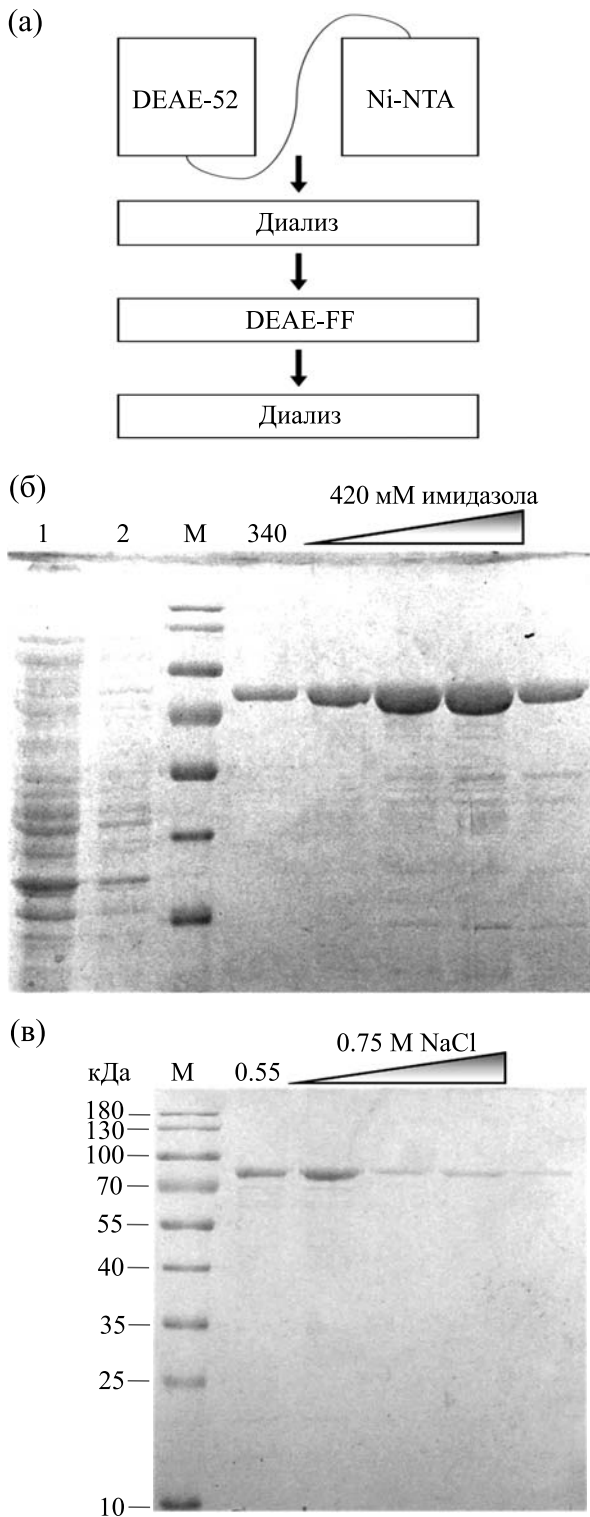


Рис. 1. Этапы очистки SsoHel308: (а) – схема очистки хеликазы SsoHel308, (б) – электрофореграмма белка при элюции с отделенной колонки Ni-NTA, (в) – электрофореграмма белка при элюции с колонки DEAE-FF.

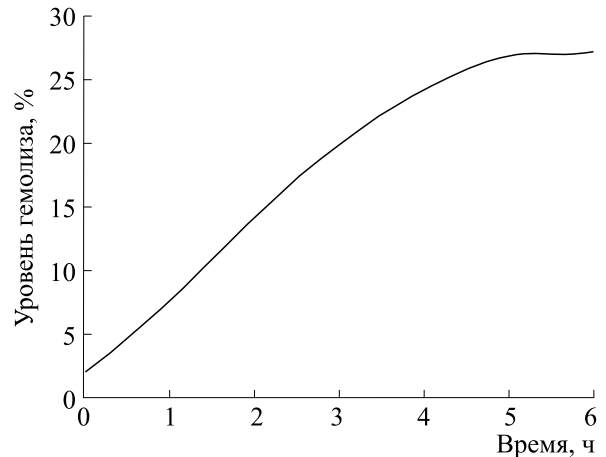


Рис. 2. Кинетика гемолитической активности хеликазы SsoHel308.

ных бактериальных клеток составил 0.73% от общего белка экстракта клеток, или 25 мл, содержащих 16 мг белка. Идентичность очищенного фермента хеликазы SsoHel308 подтвердили с использованием тандемной масс-спектрометрии (см. раздел «Материалы и методы»).

Гемолитическая активность хеликазы SsoHel308.

Хеликаза SsoHel308 способна образовывать гексамерные структуры, в центре которых образуется отверстие для транслокации односторонней ДНК. Кроме того, необходимо учитывать, что практически все бактериальные белки нуклеинового обмена способны распознавать мембраны, так как всевозможные процессы модификации ДНК проходят на бактериальных мембранах. В связи с этим было сделано предположение, что при встраивании преобразованных гексамерных форм хеликазы SsoHel308 в мембраны возможно создание пор. Для проверки этого предположения мы использовали эритроциты, нарушение целостности мембраны которых приводит к гемолизу. Образец очищенной хеликазы SsoHel308 в концентрации 0.642 мг/мл тестировали в реакции гемолиза с использованием эритроцитов кролика.

На рис 2 продемонстрирована кинетика гемолиза эритроцитов кролика при добавлении хеликазы SsoHel308 в условиях, описанных в разделе «Материалы и методы» при температуре 25°C. В этих условиях достигался 30%-й гемолиз эритроцитов в течение трех с половиной часов, что может указывать на возможность порообразования. Однако эффективность порообразования невысока. Возможно, полученный результат связан с низкой эффективностью олигомеризации (гексамеризации) хеликазы в водном растворе в услови-

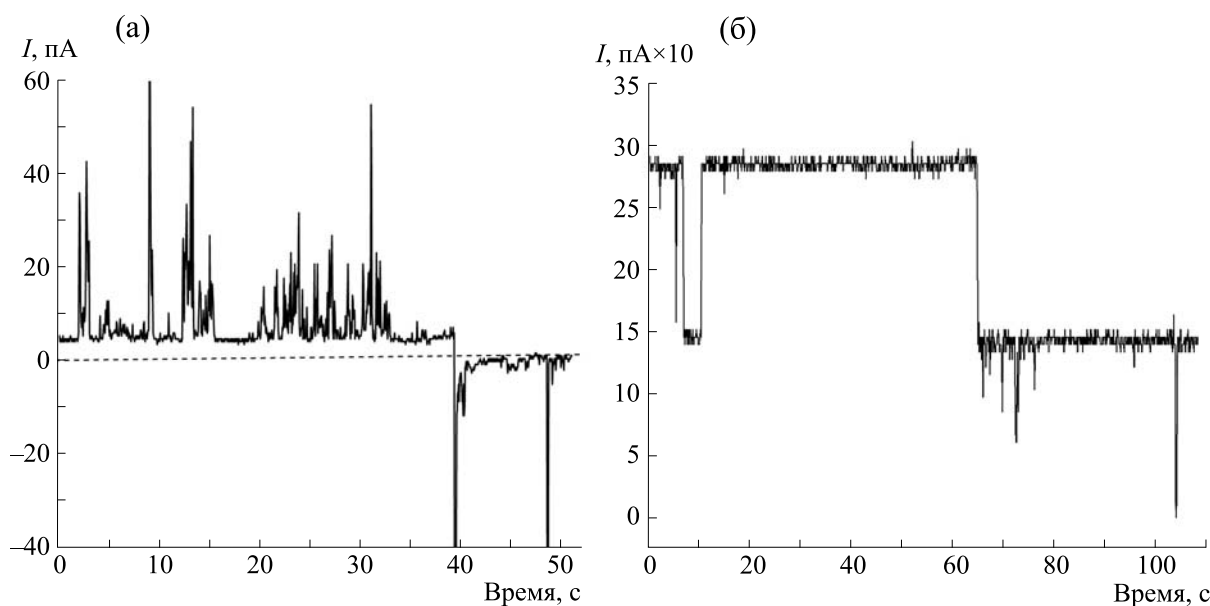


Рис. 3. Электрофизические характеристики пор, образованных хеликазой SsoHel308. (а) – Флуктуации тока при добавлении 38.52 мкг/мл хеликазы (out), напряжение ± 100 мВ. (б) – Флуктуации тока в присутствии хеликазы SsoHel308. Концентрация (out) 8.12 мкг/мл, напряжение $+100$ мВ, раствор – 1 М KCl.

ях проводимого эксперимента с последующим встраиванием в мембраны эритроцитов или с нестабильностью образуемых пор. Таким образом, показано, что хеликаза SsoHel308, которая входит в семейство хеликаз SFII, проявляет цитолитическую активность на живых эукариотических клетках, атакуя их мембрану. Ограничение времени проявления гемолитической активности может определяться стабильностью фермента в условиях эксперимента. Чтобы оценить, способна ли хеликаза SsoHel308 создавать поры в мембранах со свойствами каналов, использовали искусственные бислойные мембраны.

Добавление хеликазы до конечной концентрации 1.93 мкг/мл к искусственным бислойным мембранам увеличивало проводимость мембраны более чем на порядок. Изменения тока через мембрану проявляются отдельными всплесками. На рис. 3а видны хаотичные всплески тока как при положительном, так и при отрицательном потенциале со стороны белка. Изменения электропроводности мембраны, определяемой присутствием хеликазы, чаще проявляется при отрицательном потенциале со стороны белка. Всплески могут указывать на ограниченное время существования пор. В экспериментах мы использовали материал после длительного хранения в глицерине при -20°C с последующим диализом против буфера В. На рис. 3б видны изменения тока через мембрану в присутствии хеликазы и четкие и одинаковые

уровни отключения и включения тока. Такое поведение тока характерно для мембран с работающими ионными каналами. Обращает на себя внимание очень большая величина тока (около 150 пА), протекающая через такие структуры.

Встраивание очищенной хеликазы SsoHel308 в искусственные бислойные мембраны позволяет предположить, что этот белок является мембранным трансформером, так как он вызывает изменение проводимости бислойных липидных мембран. Суммируя полученные результаты, мы приходим к выводу, что хеликаза SsoHel308 способна образовывать поры в искусственных бислойных мембранах, и в некоторых случаях ток, протекающий через мембраны, имеет особенности, характерные для работы ионных каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было сделано предположение, что при встраивании преобразованных гексамерных форм хеликазы SsoHel308 в мембраны возможно создание пор, которые будут способны транлоцировать ДНК через естественные или искусственные мембраны, так как модификации ДНК проходят на бактериальных мембранах. В данной работе продемонстрирована принципиальная возможность формирования поры хеликазой SsoHel308 в бислойных и природных мембранах. Ранее авторы работы [7] показали возможность порообразования в бислойных мембранах шести-

мерной хеликазой E1 вируса папилломы крупного рогатого скота. E1-хеликаза относится к третьему суперсемейству хеликаз (SF3), функционирует на ранних стадиях рекомбинации после остановки репликационной вилки и обладает специфичностью для удаления отстающей нити в вилках репликации модели. Авторы использовали делеционный вариант хеликазы, лишенный активности связывающей ДНК. По сравнению с другими нативными мембранными каналами нанопора хеликазы E1 показала относительно низкую эффективность направленного переноса одноцепочечной ДНК и относительно короткое время пребывания в составе бислойной мембраны.

Мы исследовали хеликазу экстремально термофильной археи *Saccharolobus solfataricus* SsoHel308, входящую во второе суперсемейство хеликаз (SF2). Описанная ранее кристаллическая структура этой хеликазы обнаруживает пятидоменную структуру с центральной порой размером 1.3 нм, выстланной необходимыми аминокислотными остатками для связывания с ДНК [8]. Анализ пор, образуемых хеликазой SsoHel308 в искусственных бислойных мембранах, с учетом ранее опубликованных данных указывает на принципиальную возможность использования этих пор в нанопоровой технологии определения нуклеотидных последовательностей, хотя на этом этапе существуют определенные ограничения из-за короткого времени существования сформированных в мембранах пор и, следовательно, уменьшения времени прохождения полинуклеотидных цепей через пору. Хеликаза вируса папилломы крупного рогатого скота E1 (суперсемейство SF3) при встраивании в искусственные бислойные мембраны сохраняет основные активности, включая способность к транслокации ДНК в присутствии АТФ. Несмотря на то что гексамерная хеликаза SsoHel308 входит в другое суперсемейство (SF2), по-видимому, при встраивании ее основные активности также должны сохраняться.

Короткое время существования пор на мембране значительно снижает токсичность хеликазы для клетки, а возможность направленной транслокации однонитевой ДНК в присутствии АТФ позволит в будущем использовать этот фермент в качестве молекулярного шприца для инъекций однонитевых ДНК в живые клетки. В зависимости от конкретной цели применения хеликазы (например, доставка лекарственных препаратов, анализ отдельных клеток, таргетная терапия опухолевых клеток и редактирование геномов на основе CRISPR Cas системы) должна быть разработана соответствующая адресная технология.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны С.В. Тищенко за предоставление геномной ДНК *Saccharolobus solfataricus*. Масс-спектрометрический анализ был проведен на базе ЦКП «Структурно-функциональные исследования белков и РНК» (ИБ РАН, Пущино Московской области).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № RFMEFI60419X0218).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. J. Kasianowicz, A. K. Balijepalli, J. Etedgui, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1858** (3), 593 (2016). DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.09.023
2. H. Gamaarachchi, C. W. Lam, G. Jayatilaka, et al., *BMC Bioinformatics* **21** (1), 343 (2020). DOI: 10.1186/s12859-020-03697-x
3. J. M. Craig, A. H. Laszlo, I. M. Derrington, et al., *PLoS One* **10** (11), e0143253 (2015). DOI: 10.1371/journal.pone.0143253
4. S. Castella, G. Bingham, and C. M. Sanders, *Nucl. Acids Res.* **34**, 3008 (2006).
5. C. M. Sanders, O. V. Kovalevskiy, D. Sizov, et al., *Nucl. Acids Res.* **35**(19), 6451 (2007). DOI: 10.1093/nar/gkm705
6. S. S. Patel and K. M. Picha, *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 651 (2000).
7. K. Sun, C. Zhao, X. Zeng, et al., *Nat. Commun.* **10** (1), 5083 (2019). DOI: 10.1038/s41467-019-13047-y
8. J. D. Richards, K. A. Johnson, H. Liu, et al., *J. Biol. Chem.* **283** (8), 5118 (2008). DOI: 10.1074/jbc.M707548200
9. K. Alexandrov, I. Simon, V. Yurchenko, et al., *Eur. J. Biochem.* **265** (1), 160 (1999). DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00699.x
10. A. S. Syutkin, M. van Wolferen, A. K. Surin, et al., *MicrobiologyOpen* **8** (5), e00718 (2019).
11. Zh. I. Andreeva, V. F. Nesterenko, M. G. Fomkina, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1768** (2), 253 (2007). DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.11.004
12. P. Mueller, D. O. Rudin, H. T. Tien, and W. C. Westcott, *Nature* **194**, 979 (1962).

Pore-Forming Properties of SsoHel308 Helicase from *Saccharolobus solfataricus***A. V. Siunov*, M. P. Borisova**, Zh. I. Andreeva-Kovalevskaya*, A. S. Nagel*, A.S. Kolesnikov*, A.K. Surin***, ****, and A.S. Solonin***

*G.K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prospekt Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

****Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 4, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

The pore-forming activity of SsoHel308 helicase from extreme thermophilic archaea *Saccharolobus solfataricus* has been demonstrated for the first time. This protein, embedded into rabbit erythrocyte membranes, may cause erythrocyte hemolysis. It has been shown that this enzyme forms pores in a flat artificial bilayer membrane and acts as the transformer. After embedding this enzyme into bilayer lipid membranes, the membrane conductivity alters. Taken together, our results show that SsoHel308 helicase is able to form pores in artificial bilayer membranes and, in some cases, the current that flows across the membranes shares features typical of ion channels. The short lifetime of the pores in the membrane significantly reduces the toxicity of helicase for a living cell, and the possibility of directed translocation of single-stranded DNA in the presence of ATP will enable the use of this enzyme as a molecular syringe for injecting single-stranded DNA into living cells.

Keywords: helicase, extra thermophilic archaea, hemolysis, artificial bilayer membranes, pore formation