

Способность полимераз различных семейств процессировать субстраты, содержащие клик-химические модификации сахарофосфатного остова

Яковлев А.О.^{1,2*}, Ендуткин А.В.¹, Жарков Д.О.^{1,2}

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

* a.yakovlev1@g.nsu.ru

Ключевые слова: клик-химия; ДНК-полимеразы; репликация ДНК; мутации

Мотивация и цель: «Клик-химия» – молодая и активно развивающаяся область химии, включающая в себя высокоэффективные, стерео- и региоселективные реакции, которые могут протекать при физиологических условиях. Наибольшее распространение клик-химии принесла реакция азид-алкинового циклоприсоединения, катализируемая ионами меди(I). Этот класс химических реакций широко используется для функционализации ДНК, РНК и соединений ненуклеотидной природы, модифицированных алкинильными группами. В этой связи стоит выделить крайне актуальное для молекулярной биологии клик-лигирование – соединение фрагментов нуклеиновых кислот с помощью 4-метил-1,2,3-триазольной группы (trз-группы). Межнуклеозидная trз-связь по своим свойствам радикально отличается от фосфатной группы – для применения конструкторов, полученных клик-лигированием, необходимо исследовать особенности их процессинга белками, взаимодействующими с нуклеиновыми кислотами.

Для небольшого ряда полимераз было показано, что синтез ДНК по матрице, содержащей trз-связь, может проходить, при этом нуклеотидных замен обнаружено не было. Корректность синтеза была показана и в *E. coli* при трансформации плазмидной конструкцией, полученной клик-лигированием [1]. Следует отметить, что показанные результаты вступают в некоторое противоречие со структурными данными: ДНК в комплексе с ДНК-полимеразой в значительной степени изломана, что представляется более напряженной конформацией в случае межнуклеозидной триазольной группы [2]. В связи с этим исследование активности ДНК-полимераз в отношении продуктов клик-лигирования выступает актуальной задачей.

Методы и алгоритмы: Для проведения исследования были выбраны ДНК-полимеразы, относящиеся к трем семействам: A (фрагмент Кленова Pol I *E. coli* (KF)), B (RBpol и Pfu) и X (Pol β). В качестве удобной модели эукариотических полимераз (Pol δ и Pol ϵ) широкое распространение нашла полимераз фага RB69 ввиду высокой степени их гомологии.

Оценка способности выбранных полимераз синтезировать ДНК по матрице, содержащей trз-связь, была проведена с использованием двух типов конструкций для моделирования прохождения изучаемой модификации сахарофосфатного остова в двух режимах. В рамках первого исследовалась способность полимераз связывать субстрат с триазольной группой и инициировать синтез ДНК, второй же

режим репрезентировал элонгацию синтеза по модифицированной матрице. Кинетические параметры реакции включения нуклеотидов были определены в условиях стационарной кинетики.

Результаты: Полимеразы KF и RB69pol способны вести синтез в отношении содержащих *trz*-связь субстратов, однако было обнаружено, что KF в некоторой степени блокируется триазольной группой не только на стадии инициации, но и после включения первого нуклеотида. В свою очередь эффективность синтеза высокопроцессивной RB69pol оказалась значительно выше. Полимеразная активность Pfu, относящейся к тому же семейству, что и RB69pol, после включения первого за исследуемой модификацией нуклеотида полностью блокировалась. ДНК полимеразы β достраивала праймер с очень низкой эффективностью, что также свидетельствует о подавлении синтеза ДНК *trz*-связью.

Было показано, что триазольная группа в составе сахарофосфатного остова стимулирует склонность полимераз к ошибкам. За *trz*-связью в использованной конструкции следует 5-метилцитозин, комплементарный dGMP, как и обычный цитозин. Однако все исследованные полимеразы, кроме Pol β , с сопоставимой эффективностью включали и другие нуклеотиды. Так, KF оказался способен встраивать в растущую цепь dAMP и dTMP, RB69pol, кроме корректного dGMP, инкорпорировала dAMP. Pfu, в свою очередь, включала только dAMP. Несмотря на низкоэффективный синтез, Pol β демонстрировала наиболее высокую точность среди выбранных полимераз и включала только корректный нуклеотид (dGMP).

Кинетические параметры реакций включения dAMP и dGMP полимеразой KF и RB69 также были определены. С использованием соотношений констант специфичности ферментативной реакции с корректным и некорректным нуклеотидом было показано, что RB69pol не только эффективнее проводит синтез по матрице, содержащей *trz*-связь, но и демонстрирует более высокую точность в сравнении с KF.

Выводы: Таким образом, возможность применения клик-лигирования в молекулярно-биологических целях вызывает определенные сомнения, так как использование этой технологии в сборке генов может привести к ошибкам полимераз, а в экспериментах *in vivo* провоцировать возникновение мутаций.

Финансирование: Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 21-74-10104.

The ability of polymerases of different families to process substrates containing click-chemical modifications of the sugar-phosphate backbone

Yakovlev A.O.^{1, 2*}, Endutkin A.V.¹, Zharkov D.O.^{1, 2}

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

* a.yakovlev1@g.nsu.ru

Key words: click chemistry; DNA polymerases; replication; mutations

Motivation and Aim: “Click chemistry” is a young and rapidly developing field of chemistry that includes highly efficient, stereo- and regioselective reactions that can occur under physiological conditions. The most widespread reaction of click chemistry is the azide-alkyne cycloaddition catalyzed by copper(I) ions. This class of chemical reactions is widely used for the functionalization of DNA, RNA, and non-nucleotide compounds modified with alkyne groups. In this context, the connection of nucleic acid fragments using the 4-methyl-1,2,3-triazole group (trz-group), called click-ligation, is highly relevant for molecular biology and should be highlighted. The inter-nucleoside trz-bond significantly differs in properties from the phosphate group – to apply constructs obtained by click ligation it is necessary to investigate the peculiarities of their processing by proteins interacting with nucleic acids.

For a small set of polymerases, it has been shown that DNA synthesis on a template containing a trz-bond can proceed without nucleotide substitutions. The correctness of synthesis was demonstrated in *E. coli* during transformation with a plasmid construct obtained by click-ligation [1]. It should be noted that these results somewhat contradict structural data: DNA in complex with DNA polymerase is significantly bent, which seems to be a more strained conformation in the case of the inter-nucleoside triazole group [2]. Therefore, studying the activity of DNA polymerases towards click ligation products emerges as a relevant task.

Methods and Algorithms: For the study, DNA polymerases belonging to three families were selected: A (Klenow fragment of *E. coli* Pol I (KF)), B (RBpol and Pfu) and X (Pol β). As a convenient model of eukaryotic polymerases (Pol δ and Pol ϵ), the polymerase of phage RB69 has gained wide popularity due to high degree of their homology.

The ability of the selected polymerases to synthesize DNA on a template containing a trz-bond was evaluated using two types of constructs to simulate the passage of the studied sugar-phosphate backbone modification in two modes. The first mode examined the polymerases' ability to bind substrate with a triazole group and initiate DNA synthesis, while the second mode represented elongation of synthesis on the modified template. Kinetic parameters of nucleotide incorporation reaction were determined under conditions of steady-state kinetics.

Results: Polymerases KF and RB69pol are capable of synthesizing substrates containing trz-bonds, but it has been observed that KF is partially blocked by the triazole group not only during initiation but also after the inclusion of the first nucleotide. In contrast, the synthesis efficiency of the highly processive RB69pol was significantly higher. The polymerase activity of Pfu, belonging to the same family as RB69pol, was completely blocked after the inclusion of the first modified nucleotide studied. DNA polymerase β extended the primer with very low efficiency, indicating suppression of DNA synthesis by the trz-bond.

It has been shown that the triazole group in the sugar-phosphate backbone stimulates polymerases to make errors. Following the trz-bond in the used construct there is 5-methylcytosine complementary to dGMP, similar to the usual cytosine. However, all polymerases examined, except for Pol β , which showed comparable efficiency, also included other nucleotides. For example, KF was able to incorporate dAMP and dTMP into the growing chain, RB69pol incorporated dAMP in addition to the correct dGMP. Pfu, on the other hand, only included dAMP. Despite low-efficiency synthesis, Pol β demonstrated the highest accuracy among the selected polymerases and included only the correct nucleotide (dGMP).

Kinetic parameters of inclusion reactions of dAMP and dGMP by KF and RB69 polymerases were also determined. Using specificity constants for the enzymatic reaction with the correct and incorrect nucleotide, it was shown that RB69pol not only conducts synthesis more efficiently on a template containing trz-bonds but also demonstrates higher accuracy compared to KF.

Conclusion: Thus, the feasibility of using click ligation for molecular biological purposes raises some doubts, as the use of this technology in gene assembly may lead to polymerase errors and, in *in vivo* experiments, provoke the occurrence of mutations.

Funding: The study is supported by Russian Science Foundation (grant No. 21-74-10104).

Список литературы/References

1. El-Sagheer A.H. et al. Biocompatible artificial DNA linker that is read through by DNA polymerases and is functional in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(28):11338-11343
2. Rothwell P.J., Waksman G. Structure and mechanism of DNA polymerases. *Adv Protein Chem*. 2005;71:401-440