

УДК 577.113:577.151:577.152.6:577.213.32

Селективность ферментативного превращения олигонуклеотидных зондов при анализе нуклеотидных полиморфизмов ДНК

О.А. Виноградова, Д.В. Пышный*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. ак. Лаврентьева, 8

*E-mail: pyshnyi@niboch.nsc.ru

РЕФЕРАТ Анализ нуклеотидных полиморфизмов в ДНК является одной из основных задач современной ДНК-диагностики. ДНК-зависимые ферменты (ДНК-полимеразы или ДНК-лигазы) широко применяются для повышения чувствительности и надежности систем выявления точечных мутаций в генетическом материале. В данном обзоре проведена систематизация данных, связанных с изучением селективности действия ДНК-зависимых ферментов и с рассмотрением факторов структуры ферментов и ДНК-субстратов, влияющих на эффективность дискриминации мисматчей при ферментативном превращении олигонуклеотидных зондов на анализируемой ДНК-матрице. Представлены данные, характеризующие чувствительность ряда широко используемых в анализе нуклеиновых кислот ДНК-зависимых ферментов по отношению к наличию в субстратном комплексе некомплементарных пар оснований. Проанализированы особенности пространственной организации фермент-субстратных комплексов, принципиально необходимые для эффективного протекания ферментативной реакции и распознавания совершенных ДНК-субстратов. Обсуждаются показательные способы повышения селективности фермент-зависимых реакций, основанные на использовании модифицированных олигонуклеотидных зондов, «возмущающих» нативную структуру ДНК-субстратных комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-комплексы, мисматч, селективность, ДНК-лигаза, ДНК-полимераза, модифицированные олигонуклеотидные зонды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЦР – полимеразная цепная реакция, НК – нуклеиновая кислота, AdD – нуклеотидилтрансферазный домен ДНК-лигаз, OB – олигонуклеотид связывающий домен ДНК-лигаз, DBD – ДНК-связывающий домен ДНК-лигаз, HhH – мотив ДНК-лигаз спираль-шпилька-спираль, Zn – цинковые пальцы, BRCT – С-концевой домен ДНК-лигаз, PNA – пептидил нуклеиновые кислоты, LNA – замкнутые нуклеиновые кислоты, ENA – этилен-содержащие замкнутые нуклеиновые кислоты, dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат, PPi – неорганический пирофосфат, оц – основная цепь пептидного остова.

ВВЕДЕНИЕ

Однонуклеотидные замены (SNP) представляют собой наиболее часто встречающиеся генетические вариации генома. В настоящее время общее число известных однонуклеотидных мутаций в геноме человека превышает 9 миллионов [1]. Подобные мутации часто являются важными генетическими маркерами, определяющими как фенотипические и физиологические особенности индивидуума, так и молекулярные основы заболеваний.

Обнаружение однонуклеотидных замен в нуклеиновых кислотах (НК) простыми эффективными воспроизводимыми методами представляет собой большой практический интерес. Развитие методов выявления точечных мутаций, в которых используются специфические олигонуклеотидные зонды, способные распознавать комплементарные участки НК-мишеней, привело к разработке целого ряда подходов, основанных на применении ДНК-зависимых ферментов, чаще всего ДНК-полимераз [2, 3] и/или ДНК-лигаз [4, 5]. На настоящий момент в практику прочно вошли такие

методы детекции однонуклеотидных замен, как аллель-специфичная ПЦР [2, 6], минисеквенирование [7, 8], лигирование олигонуклеотидов (OLA – Oligonucleotide Ligation Assay) [9, 10], лигазная цепная реакция (LCR – Ligase Chain Reaction) [11] и другие комбинированные подходы, например модифицированная лигазная цепная реакция (Gar-LCR) [12], основанные на одновременном использовании обоих типов ферментов. В рамках большинства методов дизайн олигонуклеотидных зондов проводят таким образом, чтобы выявляемая нуклеотидная замена в анализируемой НК-матрице была в составе гибридизационного комплекса, формируя некомплементарную пару оснований (мисматч). Таким образом, детектирование мисматча, сопряженное с дуплекс-зависимым мечением зонда, может осуществляться на двух этапах. Во-первых, на этапе гибридизации (за счет снижения стабильности несовершенного комплекса) и, во-вторых, на этапе ферментативного превращения зонда (за счет уменьшения эффективности действия ферментов, обусловленного присутствием

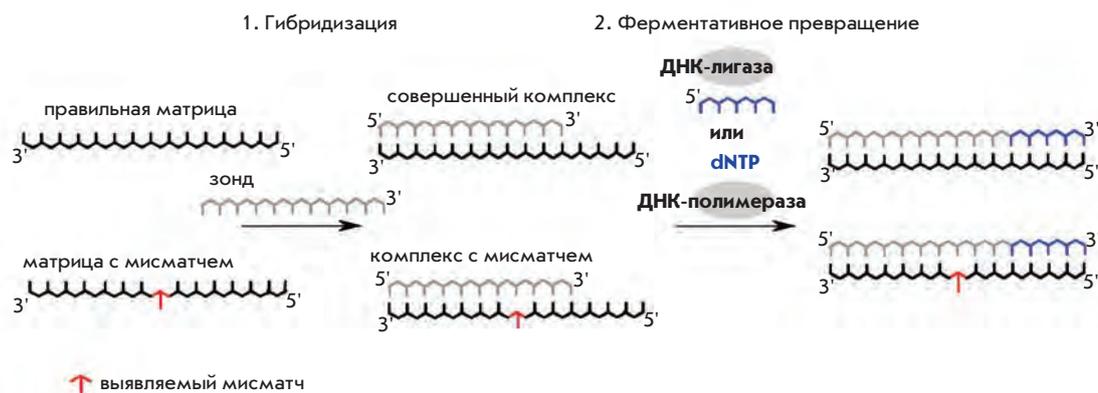


Рис. 1. Этапы гибридационного анализа ДНК с использованием олигонуклеотидных зондов и ДНК-зависимых ферментов

в ДНК-субстрате некомплементарной пары) (рис. 1). Однако в ряде случаев даже подобный двухстадийный контроль оказывается недостаточным для достоверного анализа НК. Однонуклеотидные несоответствия, нарушающие полную комплементарность ДНК-дуплекса, и в случае использования ДНК-зависимых ферментов часто не обеспечивают специфичности диагностической системы.

Поиск способов повышения достоверности анализа полиморфизмов в НК, основанных на использовании ферментов, ведется в мире уже в течение не одного десятилетия. Однако данный вопрос до сих пор сохраняет свою актуальность, поскольку предлагаемые на настоящий момент методы повышения селективности действия ДНК-зависимых ферментов часто не являются универсальными и требуют в каждом конкретном случае предварительного скрининга условий, их оптимизации в контексте решаемой задачи.

В обзоре представлены данные, характеризующие: 1) чувствительность ряда используемых в анализе нуклеиновых кислот ДНК-зависимых ферментов по отношению к наличию и типу одиночного мисматча в субстратном комплексе; 2) структурные особенности ферментов и субстратных комплексов, влияющие на селективность действия фермента. Проанализированы особенности пространственной организации фермент-субстратных комплексов, реализуемой в их составе сети белково-нуклеиновых контактов, принципиально необходимых для эффективного протекания ферментативной реакции. Рассмотрены представленные в литературе способы повышения селективности фермент-зависимых реакций, основанные на введении в структуру несовершенных ДНК-субстратов дополнительных «возмущающих» элементов: преднамеренных мисматчей и неприродных аналогов нуклеотидов.

СЕЛЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К НЕКОМПЛЕМЕНТАРНЫМ ПАРАМ В СТРУКТУРЕ ДНК-СУБСТРАТА

В представленном обзоре под селективностью ферментов будем понимать их способность в определенных условиях распознавать некомплементарную пару оснований в субстратных комплексах, т.е. снижать эффективность ферментативного превращения несовершенных комплексов по сравнению с совершенными (полностью комплементарными). Известно, что способность ферментов выявлять ту или иную некомплементарную пару в составе

ДНК-субстрата определяется ее типом, нуклеотидным окружением и расположением относительно сайта ферментативного превращения. Селективность действия ферментов зависит и от ряда внешних факторов (буферные, температурные, временные условия), поэтому при анализе литературных данных часто сложно выделить общие закономерности дискриминации ферментами одних мисматчей и толерантности к другим. Некоторые трудности анализа и сопоставления данных по эффективности выявления мисматчей обусловлены различиями в методах оценки селективности ферментов, которые используются в разных работах. Наиболее часто авторы проводят сравнение следующих характеристик: выходов продуктов ферментативной реакции; начальных скоростей накопления продукта; соотношения величин V_{max}/K_m ; рассматривают параметр разницы между величинами порогового цикла (ΔC_t – от англ. threshold cycle) при проведении ПЦР в режиме реального времени для совершенной и несовершенной систем; или же делают выводы на основании анализа частот встречаемости мисматчей в продуктах ферментативного превращения статистической библиотеки олигонуклеотидов в составе комплексов с ДНК-матрицей известной структуры.

В общем случае значительное снижение эффективности образования целевого продукта удлинения обычного олигонуклеотидного зонда с помощью ДНК-полимераз наблюдается при наличии однонуклеотидного несоответствия исключительно на 3'-конце удлиняемой цепи [13–17] и в некоторых случаях в предпоследнем от 3'-конца положении [15, 18]. В то же время присутствие во внутренней части субстратного комплекса даже нескольких мисматчей может не отражаться на накоплении продукта. Так, в работе [19] было показано, что наличие от 2 до 4 внутренних мисматчей в составе протяженных (28–30 п.н.) комплексов олигонуклеотидов-затравок с ДНК не оказывает сколько-нибудь значительного влияния на выход продукта ПЦР с участием ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (Taq). И лишь присутствие 5 и 6 некомплементарных пар оснований снижает эффективность реакции в 22 и 100 раз соответственно. Согласно другим данным одиночного нуклеотидного несоответствия, расположенного на большем удалении от 3'-конца (вплоть до -8 позиции), достаточно для снижения выхода продукта полимеразной реакции в 10 и более (до 1000) раз для зондов длиной 17–19 нт. [20].

Таблица 1. Относительная эффективность удлинения ДНК-субстратных комплексов, совершенных или содержащих 3'-концевой мисматч, под действием ДНК-полимераз



ДНК-полимераза	Соответствующий матричный нуклеотид	Праймер, 3'-концевой нуклеотид				Ссылка
		A	T	G	C	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	+	++	+	[15]
	A	+	++++	+	+	
	C	+	+	++++	+	
	G	+	+	+	++++	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	++++	++++	++++	[14]
	A	++	++++	+	++++	
	C	++++	++++	++++	+	
	G	+	++++	+++	++++	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	+++	++++	+++	[21]
	A	++	++++	+++	+++	
	C	++++	+++	++++	+++	
	G	++	+++	+++	++++	
<i>Taq</i> ДНК-полимераза	T	++++	+	++	+++	[3]
	A	+	++++	-	++	
	C	++	+	++++	-	
	G	-	++	-	++++	
обратная транскриптаза вируса птичьего миеобластога	T	++++	++	++++	++	[23]
	A	+	++++	+	++	
	C	++	++	++++	+	
	G	+	+++	-	++++	
ДНК-полимераза <i>α Drosophila melanogaster</i>	T	++++	++	++	++	[23]
	A	+	++++	+	++	
	C	++	++	++++	+	
	G	++	++	+	++++	

Примечание. «-» означает отсутствие достоверно регистрируемого продукта ферментативного превращения олигонуклеотидного зонда. При наличии продукта реакции эффективность его образования оценена по четырехбалльной шкале от «+» до «++++». Эффективность образования продукта в случае использования комплементарной матрицы всегда принималась за «++++».

Однако подобный эффект наблюдался не для всех ДНК-матриц, рассмотренных в работе [20].

При исследовании влияния типа несоответствия, расположенного на 3'-конце удлиняемой цепи, на эффективность полимеразной реакции наблюдаются некоторые общие закономерности (табл. 1), для ДНК-полимераз из разных организмов эффективность дискриминации нуклеотидных несоответствий снижается в ряду:

Pur/Pur > Pyr/Pyr > Pur/Pyr = Pyr/Pur [2, 3, 14, 22, 23], здесь и далее по тексту на первом месте обычным шрифтом указаны нуклеотиды цепи олигонуклеотида-затравки, на втором месте и жирным шрифтом – основания матричной цепи.

Согласно данным работы [3] рассчитанная по формуле $(V_{\text{пак}}/K_m)_{\text{н/мисматч}} / (V_{\text{пак}}/K_m)_{\text{н/комплемент}}$ относительная эффективность удлинения *Taq* полимеразой мисматч-содержащего

ДНК-субстрата составляет менее 10^{-6} для Pur/Pur мисматча, 10^{-4} – 10^{-5} для Pyr/Pyr и 10^{-3} – 10^{-4} для Pur/Pyr и Pyr/Pur. Подобные характеристики определены и для ДНК-полимеразы *α Drosophila melanogaster* и обратной транскриптазы вируса птичьего миеобластога (AMV RT) [23]. Для данных ферментов эффективность дискриминации по каждому типу несоответствий на порядок ниже. Как правило, накопление продукта, содержащего мисматч, полностью согласуется с представленной схемой, но полное ингибирование фермента и отсутствие полноразмерного продукта если и наблюдается, то только в случае пурин/пуриновых несоответствий [2, 3]. Однако описаны исключения и из этой закономерности. В работах [3, 14] показано, что *Taq* ДНК-полимераза не удлиняет праймер при наличии в его 3'-концевом положении пиримидин/пиримидинового мисматча C/C, или же, напротив, эффективное удлинение праймера происходит, если в данном положении комплекса ДНК-матрица/праймер присутствует мисматч C/T [3] или любой из мисматчей, образуемый остатком T на 3'-конце праймера (T/G, T/C, T/T) [14]. Согласно другому исследованию [15] праймеры, на 3'-конце которых расположены T, G или C, не удлиняются *Taq* полимеразой в случае матриц с нуклеотидными заменами в соответствующем положении, в то время как праймер с 3'-A на фоне общего снижения эффективности ПЦР с его участием приводит к сравнительно низкой дискриминации любого из 3'-концевых мисматчей 3'-A/N.

Как и для ДНК-полимераз, важным фактором, определяющим эффективность ферментативной реакции в случае ДНК-лигаз, является положение однонуклеотидного несоответствия относительно сайта превращения. Близость мисматча к сайту лигирования двух олигонуклеотидов (одноцепочечному разрыву) повышает фактор дискриминации мисматча, оказывая наиболее существенное ингибирование фермента [13, 24, 25]. Например, для ДНК-лигаз фага T4 и бактерии *Thermus thermophilus* (*Tth*) выход ферментативной реакции в случае субстрата с мисматчем, удаленным на один нуклеотид, в 2.5–5 раз меньше относительно случая, когда мисматч в субстрате локализован непосредственно в сайте превращения [24]. При лигировании статистического набора наномеров [26] и додекамеров [27] на ДНК-матрице с помощью *Tth* ДНК-лигазы и ДНК-лигазы *E.coli*, соответственно, с последующим секвенированием полученных протяженных продуктов было показано, что наибольшее количество некомплементарных пар оснований встречается в центральной части комплексов лигируемых олигонуклеотидных блоков. Мисматчи находились преимущественно в пятой позиции от 3'-конца для нанонуклеотидов [26] и в шестой или седьмой позициях от 3'-конца при лигировании додекануклеотидов [27]. Лигирование зондов, содержащих статистические нуклеотиды в первых пяти позициях с обеих сторон от одноцепочечного разрыва, показало, что и в случае ДНК-лигазы фага T4 мисматчи практически не встречаются в первых двух позициях с любой стороны относительно ника. Больше всего несоответствий наблюдается в третьей позиции, при этом наиболее высокая вероятность встречаемости мисматча T/G [28]. Отметим, что для ДНК-лигаз, кроме удаленности мисматча от одноцепочечного разрыва, важным фактором для его дискриминации является то, в составе какого из ли-

Таблица 2. Относительная эффективность лигирования ДНК-комплексов, совершенных или содержащих мисматч на 3'-конце ОН-компонента или 5'-конце Р-компонента, с помощью ДНК-лигаз



ДНК-лигаза	Соответствующий матричный нуклеотид	ОН-компонент, 3'-нуклеотид				Р-компонент, 5'-нуклеотид				Ссылка
		A	T	G	C	A	T	G	C	
Т4 ДНК-лигаза	T	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	[36]
	A	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	
	C	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	+++	
	G	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
Т4 ДНК-лигаза	T	н/о	н/о	н/о	н/о	++++	+++	++++	+++	[37]
	A	н/о	н/о	н/о	н/о	++	++++	+	+++	
	C	н/о	н/о	н/о	н/о	++++	+++	++++	++	
	G	н/о	н/о	н/о	н/о	+	++++	+	++++	
Т4 ДНК-лигаза	T	++++	+++	++	+++	н/о	н/о	н/о	н/о	[35]
	A	++	++++	+	+++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	C	+++	++++	++++	++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	G	++	++++	+++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	
ДНК-лигаза III человека	T	++++	+	+	++	н/о	н/о	н/о	н/о	[33]
	A	+	++++	-	+	н/о	н/о	н/о	н/о	
	C	+	++	++++	+	н/о	н/о	н/о	н/о	
	G	-	+++	-	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	
ДНК-лигаза <i>Chlorella virus</i>	T	++++	+	+	++	++++	++++	++++	++++	[29]
	A	++	++++	+	++	++	++++	+	+++	
	C	+	++	++++	+	+++	+++	++++	++	
	G	+	++	+	++++	+	+++	++	++++	
Тth ДНК-лигаза	T	++++	-	+	-	++++	++	++	-	[30]
	A	-	++++	-	-	+	++++	-	+	
	C	-	-	++++	-	++	+	++++	-	
	G	-	+	-	++++	+	+	-	++++	
ДНК-лигаза вируса АСЛ	T	++++	+++	+++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	[35]
	A	++	++++	++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	C	+++	++++	++++	+++	н/о	н/о	н/о	н/о	
	G	++	+++	+++	++++	н/о	н/о	н/о	н/о	

Примечание. См. примечание к табл. 1; н/о – эффективность образования продукта не оценивалась.

гируемых компонентов он находится: в дуплексной части донора 3'-гидроксильной группы (ОН-компонента) или же донора 5'-концевого фосфата (Р-компонента). ДНК-лигазы предъявляют «повышенные» требования к структуре ОН-компонента субстратного комплекса, и любое возмущение в соответствующей части ДНК-субстрата оказывает более выраженное влияние на ферментативный процесс по сравнению с аналогичным возмущением в Р-компоненте дуплекса [26–32].

Из анализа представленных в литературе данных о влиянии типа мисматча, расположенного вблизи сайта превращения, на эффективность ферментативного лигирования ДНК-субстрата довольно сложно выделить общую закономерность для ДНК-лигаз, выделенных из разных организмов (табл. 2). Лигаза *Vaccinia virus* и *Chlorella virus*, а также ДНК-лигазы I и III человека способны эффективно дискриминировать лишь 3'-пуриновые мисматчи,

локализованные со стороны ОН-компонента [29, 30, 33, 34]. В случае ДНК-лигазы *Chlorella virus* также 5'-G/A и A/G мисматчи со стороны Р-компонента приводят к значительному снижению (в 100 раз) эффективности лигирования несовершенного субстрата относительно совершенного [29]. Большинство же однонуклеотидных несоответствий в Р-компоненте комплекса практически не дискриминируется вышеуказанными ДНК-лигазами. Наиболее плохо распознаются тимидин-содержащие мисматчи: 5'-C/T и G/T [33]. ДНК-лигаза археи, *Thermococcus kodakaraensis*, чувствительна ко всем 3'-несоответствиям в ОН-компоненте, а в случае мисматчей с участием 5'-концевого нуклеотида Р-компонента распознает только пуриновые мисматчи [31]. ДНК-лигаза вируса африканской свиной лихорадки (АСЛ), по сравнению с другими изученными ДНК-лигазами, наоборот, самая нечувствительная по отношению к 3'-несоответствиям в ОН-компоненте [35]. Данная ДНК-лигаза проявля-

ет наиболее высокую точность, определенную по формуле $(V_{\max}/K_m)_{\text{мисматч}}/(V_{\max}/K_m)_{\text{комплемент}}$ и равную 10^{-4} , для субстрата с мисматчем 3'-G/A, наиболее низкую (равную 2.7) для комплекса с мисматчем 3'-T/C, превращаемым эффективнее случая совершенных субстратов. Для *Tth* ДНК-лигазы при лигировании статистического набора зондов было показано формирование в основном пурин-содержащих мисматчей (G/T, G/A, G/G, A/G), встречающихся в 86 % случаев, из них 71 % некомплементарных пар содержал остаток гуанина [26]. Кроме того, при лигировании библиотеки была отмечена неравнозначность изомисматчей G/T и T/G, встречаемость которых составила 14 и 2 раза (общее количество образуемых мисматчей 57) при расположении гуанина в составе лигируемой и матричной цепи соответственно [26]. Аналогичный эксперимент по лигированию библиотеки олигонуклеотидов с помощью ДНК-лигазы *E.coli* также выявил накопление преимущественно G/T мисматчей [27]. В то же время в ряде работ показано, что T4 ДНК-лигаза способна лигировать большинство мисматчей вне зависимости от их расположения относительно сайта ферментативного превращения [32, 36, 37]. Тем не менее согласно [35] к дискриминируемым мисматчам можно отнести 3'-концевые пурин/пуриновые несоответствия, кроме 3'-G/G, и пиримидин/пиримидиновый мисматч 3'-C/C, точность их превращения T4 ДНК-лигазой, согласно указанной выше формуле, составляет 10^{-4} – 10^{-6} .

Литературные данные по эффективности выявления одиночных мисматчей вблизи сайта ферментативного превращения ДНК-полимеразами и ДНК-лигазами сведены в табл. 1 и 2 соответственно. Представленные данные подтверждают все отмеченные выше особенности протекания реакций с участием ДНК-зависимых ферментов в случае ДНК-субстратов с одиночным мисматчем.

Таким образом, с абсолютной уверенностью можно говорить только о том, что ДНК-полимераза и ДНК-лигаза при превращении нативных дуплексов часто не демонстрируют исключительную селективность действия, которой было бы достаточно для надежного выявления любых

нуклеотидных несоответствий в субстратном дуплексе, сформированном на основе нативных олигонуклеотидов. Следовательно, одной из первоочередных задач при разработке методов выявления точечных мутаций с помощью систем, основанных на использовании ДНК-зависимых ферментов, является систематический анализ факторов, определяющих чувствительность таких молекулярных систем к локальным нарушениям в структуре комплексов зонд/ДНК. С нашей точки зрения аспекты, связанные со строением рассматриваемых диагностически значимых ферментов, ДНК-лигаз и ДНК-полимераз, а также с особенностями пространственной организации их комплексов с субстратами, позволят определить возможные пути повышения селективности анализа ДНК и обосновать их эффективность.

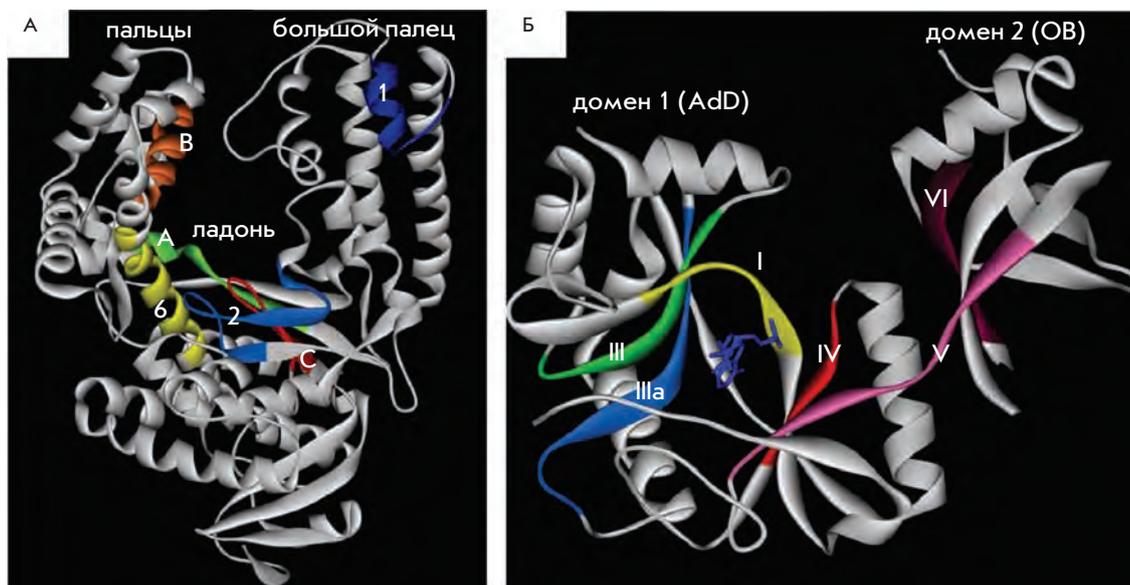
ОСОБЕННОСТИ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗ И ДНК-ЛИГАЗ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С ДНК-СУБСТРАТОМ

ДНК-полимераза и ДНК-лигаза катализируют образование новых фосфодиэфирных связей между нуклеотидными компонентами-предшественниками в составе двухцепочечных структур ДНК. Относясь к разным классам ферментов, они, тем не менее, имеют значительные сходства, как в плане наличия общих структурных элементов, так и в особенностях взаимодействия с ДНК-субстратом.

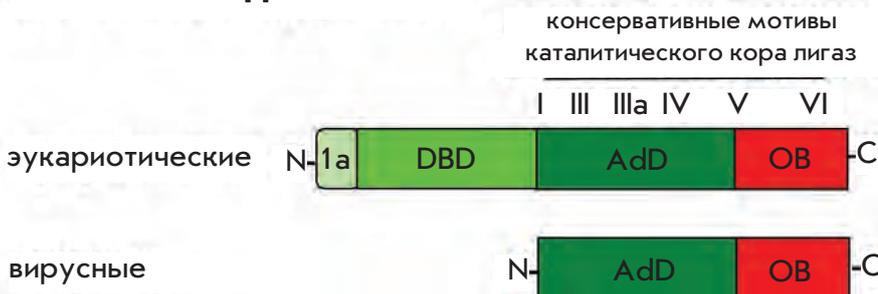
ОБЩИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ДОМЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ И СТРУКТУРЫ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ДНК-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

Каталитический кор выделенных из разных организмов ДНК-полимераз, отличающихся по аминокислотной последовательности и относящихся к разным семействам, имеет схожую архитектуру и содержит три домена, пространственная организация которых напоминает по форме полуоткрытую кисть руки. Домены имеют соответствующие названия: «ладонь», «большой палец» и остальные «пальцы» (рис. 2, А) [38–40]. В доменах ДНК-полимераза се-

Рис. 2. Пространственные структуры и доменная организация *Taq* ДНК-полимеразы в свободном состоянии (А) и ДНК-лигазы *Chlorella virus* в аденилированном состоянии (Б). Отдельные мотивы выделены разными цветами. Изображения получены с использованием структур PDB 1TAQ [41] и 1FVI [54] соответственно



АТФ-зависимые ДНК-лигазы

NAD⁺-зависимые ДНК-лигазы

мейства А выделяют шесть эволюционно консервативных мотивов (А, В, С, 1, 2 и 6), которым отводится основная роль в формировании активного центра и сети специфических контактов с ДНК-субстратом [39–42]. Из них наиболее консервативны мотивы А, В и С, два из которых (А и С) присутствуют во всех известных ДНК- и РНК-полимеразах. Мотивы 1, 2 и 6 обладают достаточно консервативной пространственной организацией, но в них допускаются большие вариации аминокислотных последовательностей. Данные домены, по сравнению с высококонсервативными А, В и С, в меньшей степени вовлечены в формирование контактов с ДНК. Для захвата дцДНК-субстрата фермент использует «ладонь» (мотивы А, 2, 6) и домен «большой палец» (мотив 1). Домен «пальцы», смыкаясь над «ладонью», формирует карман (полость) для вновь образуемой пары оснований, главным образом за счет аминокислотных остатков мотива В. Фрагменты, ответственные за фиксацию 3'-конца праймера, встраиваемого нуклеотида и двух необходимых для катализа ионов магния, локализованы на внутренней стороне «пальцев» (мотивы В, 6) и на плоскости «ладони» у основания «пальцев» (мотивы А, С). Активный центр полимераз, в котором осуществляется встраивание нуклеотидов в растущую цепь, расположен на домене «ладони» [40, 42]. Некоторые ДНК-полимеразы содержат дополнительные домены, например, обеспечивающие 3' → 5' экзонуклеазную активность.

Как и ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы разных организмов имеют структурно схожий минимальный каталитический центр, формируемый из двух дискретных доменов: N-концевого (AdD) каталитического и меньшего по размеру С-концевого (OB) регуляторного (рис. 2, Б, 3). Активный сайт лигаз образован, в основном, шестью консервативными мотивами (I–VI). Пять из них (I, III, IIIa, IV и V) входят в состав N-концевого домена 1 (AdD) и образуют нуклеотид-связывающий карман. Этот домен отвечает за узнавание и специфическое связывание с АТФ (или NAD⁺), и в нем, в мотиве I, содержится остаток лизина, подвергающийся аденилированию при активации фермента. Через мотив V домен 1 соединяется с олигонуклеотид/олигосахарид связывающим доменом 2 (OB) [43–46]. Связывание ДНК-

субстрата с ферментом происходит в междоменной щели с участием, в т.ч., мотива V [43]. Помимо основных доменов лигазы эукариот содержат на N-конце дополнительный ДНК-связывающий домен (DBD), необходимый для катализа и позволяющий более плотно окружить ДНК-дуплекс [44, 47]. На С-конце NAD⁺-зависимых лигаз находятся домены: «цинковые пальцы» (Zn), «спираль-шпилька-спираль» (HhH) и др. Они являются аналогом DBD-домена, повышают эффективность связывания субстрата и/или точность распознавания повреждений в его составе [44] (рис. 3).

Структурную организацию ДНК-лигаз, так же как ДНК-полимераз, соотносят с формой кисти руки, домен 1 ассоциируют с ладонью, домен 2 – с пальцами [48]. Подобное сопоставление доменов данных ДНК-зависимых ферментов обосновано и при рассмотрении их структурных перестроек, сопровождающих ферментативную реакцию.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Для проведения эффективного катализа молекулы ДНК-процессирующих ферментов претерпевают конформационные переходы. В ходе каталитического цикла в полимеразы выделяют две основные структурные перестройки (рис. 4). Первая сопряжена со связыванием ДНК-субстрата, который входит в раскрытую щель между «большим пальцем» и «ладонью» фермента. Верхний край «большого пальца», вступая во взаимодействие с субстратом со стороны малой бороздки двойной спирали, склоняется к плоскости «ладони». В результате этой перестройки в молекуле фермента образуется полый цилиндр, внутри которого плотно фиксирован фрагмент спирали ДНК. Далее реализуется второй конформационный переход – поворот «пальцев» к «ладони», сопряженный со связыванием в активном центре полимеразы нуклеозидтрифосфата. Этот переход называют переходом фермента из «открытого» в «закрытое» состояние, он завершает позиционирование и фиксацию субстрата в активном центре фермента. Именно на данном этапе происходит формирование необходимых контактов между доменом «пальцы» и встраиваемым нуклеотидом, что позволяет оценить геометрию переходного состояния,

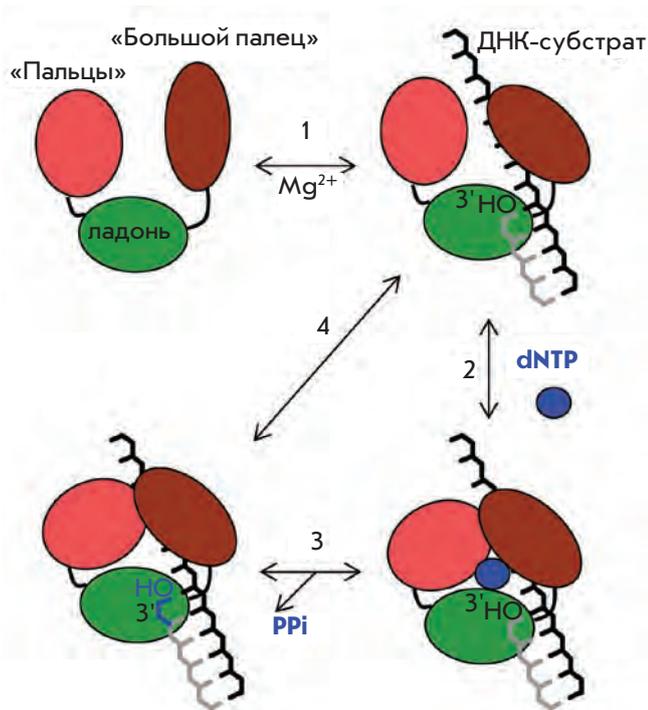


Рис. 4. Схематичное представление конформационных перестроек ДНК-полимераз в ходе ферментативного удлинения ДНК-субстрата

а в результате и комплементарность формируемой пары оснований [49–51].

Изменения структуры фермента сопровождаются подстройками ДНК-субстрата, преимущественно происходящими на этапе образования комплекса дуплекс/полимеразы. На участке ДНК-дуплекса вблизи сайта ферментативного превращения регистрируются изменения структуры углеводно-фосфатного остова, а именно переход остатков дезоксирибозы из С2'-эндо- в С3'-

эндоконформацию. В результате форма малой бороздки значительно изменяется. Она становится более мелкой и широкой. Ширина бороздки резко возрастает с 7 Å (ДНК-спираль в свободном состоянии) до 9–10 Å (в комплексе с ферментом). Таким образом, фрагмент спирали ДНК-дуплекса переходит из В-формы в А-подобную [49, 51, 52] (рис. 5). Данные изменения в структуре фиксированного на ферменте ДНК-субстрата затрагивают не более 4–5 п.н. [49, 51, 52]. При связывании в активном центре дезоксирибозы, т.е. при переходе к «закрытому» комплексу, происходят дополнительные изменения конформации субстрата, затрагивающие одноцепочечный фрагмент матричной цепи, который оказывается четко фиксированным [51].

ДНК-лигазы при проявлении каталитической активности также претерпевают конформационные переходы между «открытым» и «закрытым» состояниями. «Закрытие» фермента начинается при его связывании с нуклеотидными кофакторами, АТФ или NAD⁺, в результате чего подвижный домен 2 сближается с доменом 1 (рис. 6). Молекула АТФ (NAD⁺) координируется в позиции, благоприятной для нуклеофильной атаки ε-аминогруппы консервативного остатка лизина по α-фосфату АТФ (NAD⁺). Кроме того, такая перестройка приводит к формированию непосредственно каталитически активного центра и вызывает поворот ДНК-связывающего домена к активному центру [44, 47, 53, 55]. В результате подобных перестроек только аденилированный фермент приобретает конформацию, способную распознать и захватить ДНК-субстрат [44]. Окончательное «закрытие» фермента происходит при его связывании с ДНК и приводит к тому, что аденилирующий и ОВ-домены, а также DBD или HhN плотно окружают ДНК-субстрат вблизи одноцепочечного разрыва.

По аналогии с данными, полученными для ДНК-полимераз, высказывалось предположение о том, что и в комплексе с ДНК-лигазами часть ДНК-субстрата переходит из В- в А-форму [48]. Одним из установленных фактов, подтверждающих эту гипотезу, было то, что полость между доменами ДНК-лигазы, в которой происходит связывание дуплекса, изогнута, и именно изогнутый В-А

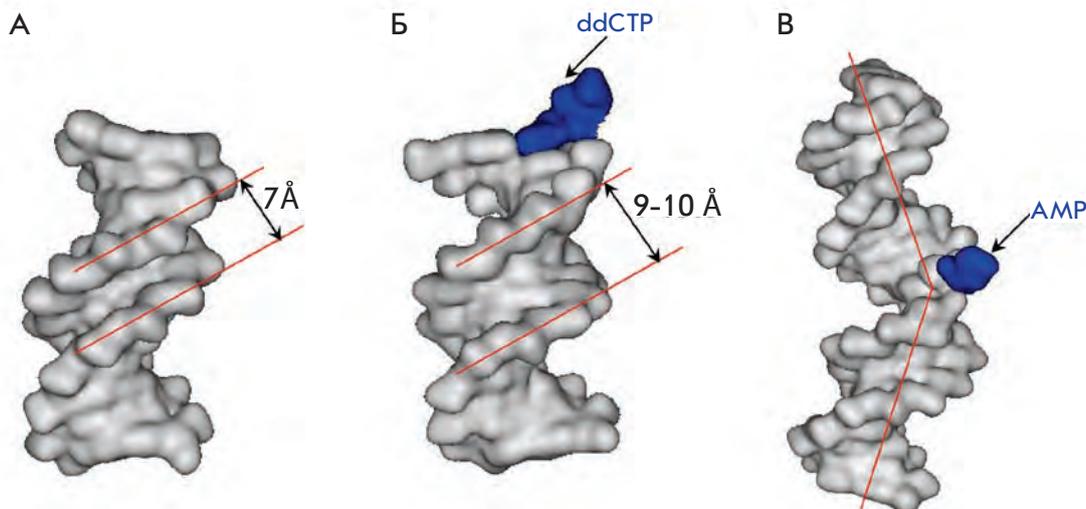


Рис. 5. Изображение структуры В-формы ДНК-дуплекса (PDB 1BNA 12 п.н.) [53] (А), гибридной формы ДНК-субстрата в активном центре Taq ДНК-полимеразы (PDB 3KTO 12–13 п.н.) [51] (Б), ДНК-лигазы *Chlorella virus* (PDB 2Q2T 21 п.н.) [57] (В)

гибридный дуплекс ДНК, вероятно, может структурно подходить данному сайту активной формы фермента [47]. Позже подобные перестройки субстрата были подтверждены рентгеноструктурным анализом комплексов ДНК с ДНК-лигазой I человека [47]. В данном случае деформация спирали ДНК к А-подобной форме наблюдалась только в части дуплекса со стороны ОН-компонента. Аналогичные данные по комплексам с участием ДНК-лигаз из *E.coli* и *Chlorella virus* [56, 57] свидетельствуют о том, что при связывании с ферментом участки ДНК, расположенные с обеих сторон от одноцепочечного разрыва, частично переходят в А-форму (рис. 5, В). Протяженность таких несколько раскрученных фрагментов ДНК в зависимости от фермента варьирует от одной до шести пар нуклеотидов [47, 48, 55–57].

Отметим, что В → А переход спирали ДНК описан и для других ДНК-зависимых ферментов (например, ДНКаза I) и ДНК-связывающих белков [58]. Считается, что одной из основных причин такой трансформации субстрата является резкая дегидратация двойной спирали в гидрофобной ДНК-связывающей полости фермента, способствующей именно такой перестройке дцДНК.

БЕЛКОВО-НУКЛЕИНОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ В РЕАКЦИОННОМ КОМПЛЕКСЕ ФЕРМЕНТ/ДНК-СУБСТРАТ

Изменения, происходящие в структурах фермента и субстрата, приводят к их четкой «подстройке» друг к другу, обеспечивая формирование целой сети белково-нуклеиновых контактов на основе водородных и ионных связей, Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Сеть контактов очень специфична, часто именно консервативные аминокислотные остатки активных центров ферментов вовлекаются в ее формирование. Раскручивание ДНК-дуплекса вблизи активного центра фермента повышает доступность различных центров в малой бороздке двойной спирали для взаимодействия с группировками в структуре белка. Основная часть таких взаимодействий – это тесные сиквенс-независимые контакты, формируемые за счет водородных связей между типичными для любой канонической пары оснований центрами (акцепторами электронов, расположенными в N3 позиции пуриновых оснований и O2 пиримидиновых остатков) и консервативными остатками белка [51, 52, 59, 60]. В свою очередь индуцированная А-форма дуплекса стабилизируется за счет сети Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий аминокислотных остатков с углеводными фрагментами и/или гетероциклическими основаниями нуклеотидов [43, 47, 51, 52].

Участок ДНК, в котором полимеразы семейства А взаимодействуют с малой бороздкой дуплексной структуры, составляет около 4–5 пар оснований от 3'-конца праймерной цепи. Рентгеноструктурным анализом было показано, что к аминокислотным остаткам, формирующим контакты в бороздке, для ряда полимераз семейства А (*Taq*, *Bst* и др.) относятся (например, для *Taq* ДНК-полимеразы):

– аргинин Arg573, который образует водородную связь как с нуклеотидом, расположенным непосредственно на 3'-конце праймера, так и с его компонентом в матрице;

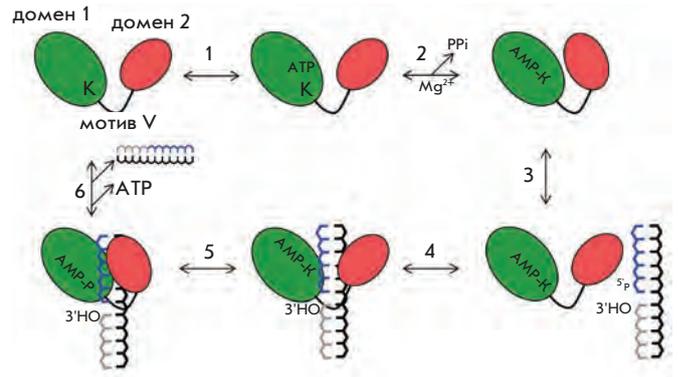


Рис. 6. Схематичное представление конформационных перестроек ДНК-лигазы в ходе ферментативного лигирования ДНК-субстрата с одноцепочечным разрывом. К – консервативный остаток лизина, аденилируемый на первом этапе ферментативной реакции

- глутамин Gln754, который взаимодействует с тем же матричным нуклеотидом;
- аспарагин (Asn583) и лизин (Lys540), контактирующие с нуклеотидами, расположенными в 3-й и 4-й, 5-й позициях от 3'-конца удлиняемой цепи соответственно [51, 61, 62] (рис. 7).

Таким образом, протяженность участка ДНК-комплекса, малая бороздка которого вовлечена в формирование водородных связей, соответствует длине фрагмента ДНК, подверженного переходу спирали в А-форму. Отметим, что нуклеотиды, находящиеся вблизи сайта ферментативного превращения, кроме контактов в малой бороздке формируют способствующие закреплению цепи ДНК в А-форме Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия с остатками аминокислот (гистидин, аргинин, тирозин) [43, 47, 51]. За пределами этого участка, т.е. дальше 4–5 п.н. от сайта элонгации, конформация дцДНК практически полностью соответствует В-форме, что определяет возможность реализации белково-нуклеиновых контактов исключительно с участием остатков углеводно-фосфатного остова, подобные контакты не являются сиквенс-специфичными [43, 51, 52]. Взаимодействия в данной области фермент-субстратного комплекса в основном электростатические и Ван-дер-Ваальсовы. Всего полимеразы семейства А образуют различные контакты с 5–8 парами оснований ДНК-дуплекса от 3'-конца удлиняемой цепи [43, 51, 52, 61], в них участвуют более 40 консервативных аминокислот [63–65] (рис. 7, А, Б).

Кристаллические структуры комплексов ДНК-лигаза/дцДНК-субстрат, имитирующих реакционное состояние, были получены и охарактеризованы относительно недавно и только для некоторых ферментов. До этого были определены лишь размеры участков связывания ДНК-лигаз на субстрате с использованием разных методов футпринтинга. Исследования показали, что размеры участков, накрываемых ферментом на ДНК по обе стороны от одноцепочечного разрыва, различаются. Фермент связывает 7–12 п.н. со стороны Р-компонента и 3–9 п.н. со стороны ОН-компонента [66, 67]. Суммарный участок взаимодействия ДНК-субстратом с лигазой ва-

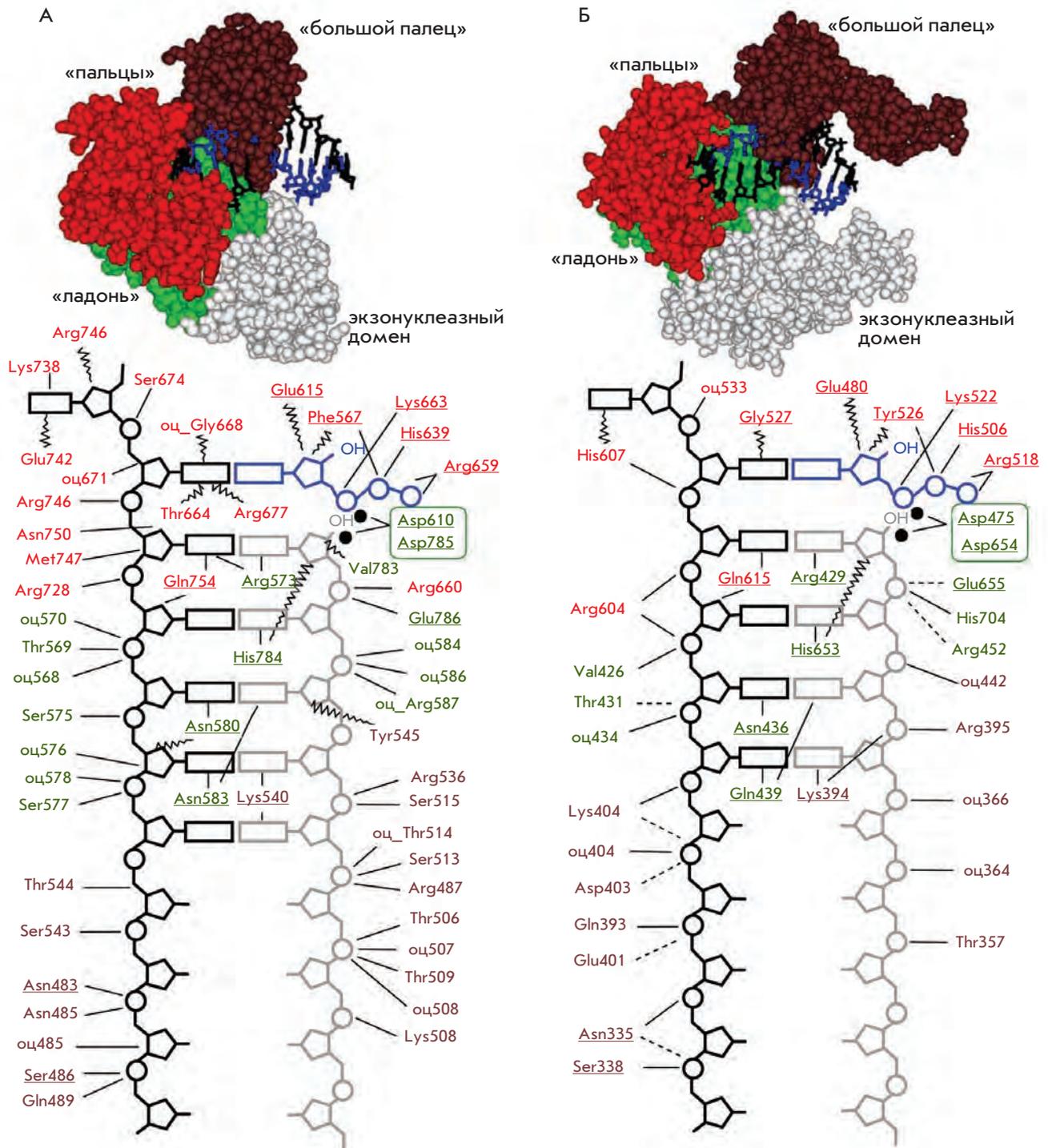


Рис. 7. Схематическое изображение сети белково-нуклеиновых взаимодействий, реализуемых в реакционном комплексе между ДНК-субстратом, dNTP и *Taq* ДНК-полимеразой [51, 61] (А) или *T7* ДНК-полимеразой [49] (Б). Показаны прямые контакты (сплошные линии), образованные через молекулы воды (пунктирные линии), Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (волнистые линии). Аминокислотные остатки разных доменов ферментов изображены разным цветом. Высококонсервативные остатки полимераз семейства А подчеркнуты. Взаимодействия, образуемые основной цепью остатков пептидной цепи фермента, обозначены префиксом «оц». Ионы металлов – черные круги. Сверху представлены пространственные структуры соответствующих фермент-субстратных комплексов, полученные с помощью PDB структур 3KTQ [51] (А) и 1T7P [49] (Б)

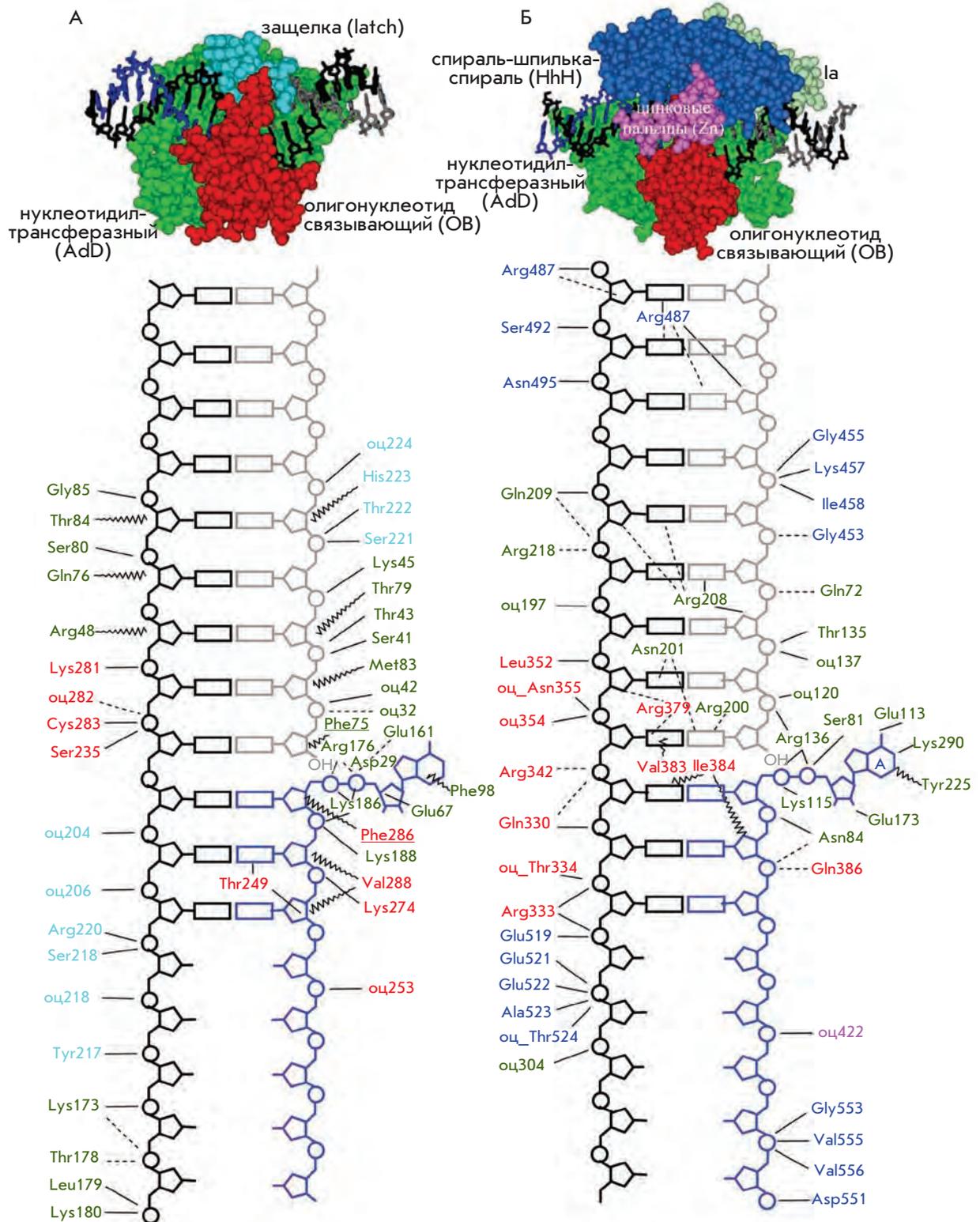


Рис. 8. Схематическое изображение сети белково-нуклеиновых взаимодействий, реализуемых в реакционном комплексе между аденилированным ДНК-субстратом и ДНК-лигазой *Chlorella virus* (А) [57] или ДНК-лигазой *E. coli* (Б) [56, 69]. Показаны прямые контакты (сплошные линии), образованные через молекулы воды (пунктирные линии), Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия (волнистые линии). Аминокислотные остатки разных доменов ферментов изображены разным цветом. Взаимодействия, образуемые основной цепью остатков пептидной цепи фермента, обозначены префиксом «оц». Сверху представлены пространственные структуры соответствующих фермент-субстратных комплексов, полученные с помощью PDB структур 1FVI [51] (А) и 2OWO [56] (Б)

рирует от 10 до 20 п.о. в зависимости от фермента. Например, для АТР-зависимой ДНК-лигазы бактериофага Т7 (41 кДа, 359 аминокислотных остатков (а.о.)) с помощью химического футпринтинга показано, что фермент занимает 3–5 п.о. в направлении 3' → 5' от ника и 7–9 п.н. в противоположном от него направлении вдоль лигируемой цепи [66]. С использованием ферментативного (экзонуклеаза III) футпринтинга установлено, что ДНК-лигаза *Chlorella virus* (34 кДа, 298 а.о.) способна покрывать 19–21 п.н. в ДНК-субстрате, из них 11–12 п.н. со стороны донора 5'-фосфата и 8–9 п.н. по другую сторону одноцепочечного разрыва [67]. Для Т4 ДНК-лигазы (55 кДа, 487 а.о.) по данным работ [13, 68] аналогичные характеристики, представленные далее в том же порядке, составили 11–12, 6–7 и 5 п.н. соответственно.

В настоящее время предоставляется возможность систематизации взаимодействий ДНК-лигаз с субстратами, установления схожих по функциональности аминокислотных остатков для ферментов из различных источников. Известно, что комплекс лигазы с ДНК-субстратом сформирован сетью связей, координирующих остаток 5'-концевого фосфата Р-компонента, пронизывающих малую бороздку ДНК-дуплекса вблизи одноцепочечного разрыва, и контактов с углеводно-фосфатным остовом каждой из цепей ДНК-субстрата [47, 56, 57, 69, 70]. На рис. 8, А и В представлена карта тесных контактов, реализуемых между субстратом и ДНК-лигазами *Chlorella virus* и *E.coli*. Доказано, что в формировании связей с ДНК-субстратом участвуют все домены фермента. При этом основная часть точечных межмолекулярных взаимодействий приходится на водородные связи, реализуемые аминокислотными остатками с фосфатными группировками ДНК. Согласно рентгеноструктурным данным такие взаимодействия затрагивают около 8 и 5–6 п.н. со стороны Р- и ОН-компонентов субстрата соответственно [56, 57]. Связи между экспонированными в малую бороздку группировками гетероциклических оснований и аминокислотными остатками фермента затрагивают лишь по две нуклеотидные пары с каждой стороны от одноцепочечного разрыва [56, 57]. Именно такой спиральный участок дуплекса и претерпевает В → А переход в комплексе с данным ферментом [57]. Эта же зона ДНК-субстрата вовлечена в формирование Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с лигазой. Для целого ряда ДНК-лигаз подобные контакты реализуются за счет остатков аргининов и/или фенилаланинов, встраиваемых в малой бороздке ДНК-дуплекса между углеводными остатками [56, 57]. В случае эукариотических и NAD⁺-зависимых ферментов значительную роль в формировании контактов в малой бороздке играют, соответственно, DBD и HhH домены [56, 57, 69, 70]. Кроме того, для ряда ДНК-лигаз показан изгиб ДНК-субстрата в активном центре фермента (рис. 5, В). В случае ДНК-лигазы *E.coli* показано, что домен HhH, образуя контакты с фосфодиэфирным остовом в четырех позициях, стабилизирует вблизи ника изгиб главной оси спирали ДНК, равный по величине 10° [57] (рис. 8, В). Авторы отмечают, что мотив HhH, образованный пятью α-спиральными субмотивами, обнаружен во многих ДНК-связывающих белках [57, 71, 72].

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ЭФФЕКТИВНОЕ ПРОЦЕССИРОВАНИЕ ДНК-СУБСТРАТА В ХОДЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ

Существует множество предположений о факторах, определяющих чувствительность ДНК-зависимых ферментов к наличию неканонических пар оснований в распознаваемой части ДНК-субстрата, т.е. факторов, обуславливающих селективность действия ферментов, в частности ДНК-лигаз и ДНК-полимераз. Ниже будут представлены только некоторые из них.

В качестве критериев реализации ферментативного катализа долгое время выделяли наличие канонических водородных уотсон-криковских связей вблизи процессируемой части субстрата и/или их стабильность, а также стабильность субстратного комплекса в целом, в контексте изучения модельных систем на основе олигонуклеотидов. Механизм, с помощью которого достигается селективное превращение субстратов, не выяснен полностью до настоящего времени. Все больше фактов свидетельствует в пользу того, что контакты между ферментом и субстратом не только способствуют фиксации и подстройке последнего в активном центре, но и ответственны за распознавание субстратов, содержащих мисматчи или другие возмущения регулярной структуры ДНК.

Одним из критериев определения ферментами несоответствий в составе ДНК может оказаться вызываемое мисматчами искажение ДНК-спирали за счет своей неканонической формы. Данное утверждение подтверждается на примере 5-фторурацила, образующего пару с гуанином (рис. 9). Такая модифицированная пара является «качающейся», т.е. в зависимости от рН раствора может находиться в виде пары, схожей по форме с уотсон-криковской С/Г или отличной от нее (рис. 9) [73]. Присутствие в сайте протекания реакции лигирования стабильной, но неканонической по форме пары оснований значительно снижает выход реакции в случае *Tth* и Т4 ДНК-лигаз относительно пары 5-фторурацил/гуанин, обладающей геометрией, аналогичной геометрии комплементарной пары [73]. Неканоническая форма нуклеотидных пар: урацил/гуанин, урацил/гипоксантин (рис. 9) также приводит к снижению эффективности лигирования *Tth* лигазой ДНК-комплексов,

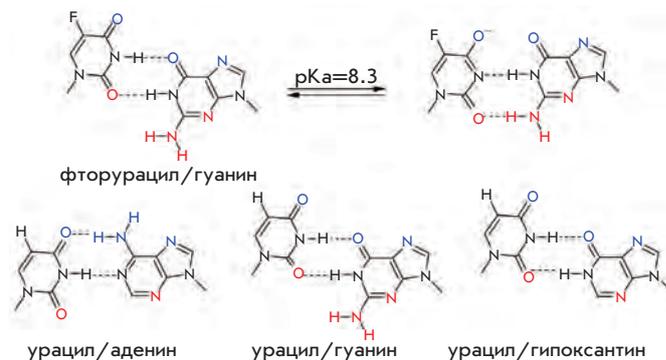


Рис. 9. Модифицированные пары оснований неканонической формы. Синим и красным обозначены атомы – доноры/акцепторы водородных связей, обращенные в большую и малую бороздки соответственно

содержащих подобные пары в сайте одноцепочечного разрыва. Показано, что замедление ферментативной реакции происходит на этапе аденилирования ДНК-субстрата [73].

Еще одной составляющей обеспечения селективности ферментативного процесса является формирование ферментом водородных связей в малой бороздке субстратного ДНК-комплекса. Дело в том, что акцепторы водородных связей гетероциклических оснований, обращенные в малую бороздку, однотипно расположены для всех четырех правильных пар оснований (учитывая различную роль процессируемой и матричной цепей ДНК-субстрата) и отличаются для некоплементарных пар [59] (рис. 10, А). Подобная топологическая особенность может способствовать различению мисматчей и совершенных пар. Косвенным доказательством важности подобных контактов может служить и то, что, например, ДНК-полимераза β человека и обратная транскриптаза ВИЧ-1 (HIV RT), образующие лишь одну связь в малой бороздке спирали ДНК, характеризуются беспорядочным удлинением ДНК-дуплексов с мисматчем(ами) по сравнению с полимеразы семейства А, формирующими многоточечные контакты [60, 74].

Роль фермент-субстратных контактов в малой бороздке исследовали с использованием как аналогов нуклеотидов в составе ДНК, так и мутантных форм ферментов. Из представленных ранее структур фермент-субстратных комплексов видно, что основания пары нуклеотидов в сайте ферментативного превращения всегда задействованы в формировании водородных связей с аминокислотными остатками. Для установления важности таких контактов в качестве одного из нуклеотидов этой пары вводили различные неприродные аналоги: 3-деазогуанин (аналог гуанина) [75, 76], 2,4-дифтортолуол (аналог тимидина) [73, 77], 4-метилбензимидазол (аналог аденозина) [77] (рис. 10, Б). Присутствие в ДНК-субстрате подобных модифицированных нуклеотидов, схожих по форме с природными аналогами, но не содержащих в малой бороздке акцепторов водородных связей, становилось одной из причин прерывания ферментативной реакции с участием как ДНК-полимераз (фрагмент Кленова [75, 77], *Taq*, T7, HIV RT, полимераз α и β [77]), так и ДНК-лигаз (*Tth* и T4) [73]. Только для случая расположения модифицированного аналога непосредственно в сайте ферментативного превращения было показано значимое снижение эффективности реакции с участием ДНК-полимераз [77]. Введение аналогов нуклеотидов в разные цепи субстрата выявило для рассмотренных ДНК-полимераз, что для протекания ферментативной реакции необходимо формирование водородных связей в малой бороздке со стороны праймерной цепи и только в случае HIV RT в матричном компоненте [77].

Рассмотрение роли взаимодействий в малой бороздке с точки зрения структуры фермента проводили с использованием мутантных форм фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E.coli* (фрагмент Кленова) [76, 78, 79]. Мутанты R668A и Q849A имели замены аминокислот, вовлекаемых в исходном ферменте в формирование водородных связей с гетероциклическими основаниями 3'-концевой пары нуклеотидов удлиняемой и матричной цепей соответственно. Функциональные аминокислотные остатки заменяли на аланин, боковой радикал которого не имеет доноров водородных связей. Замена R668A приводила

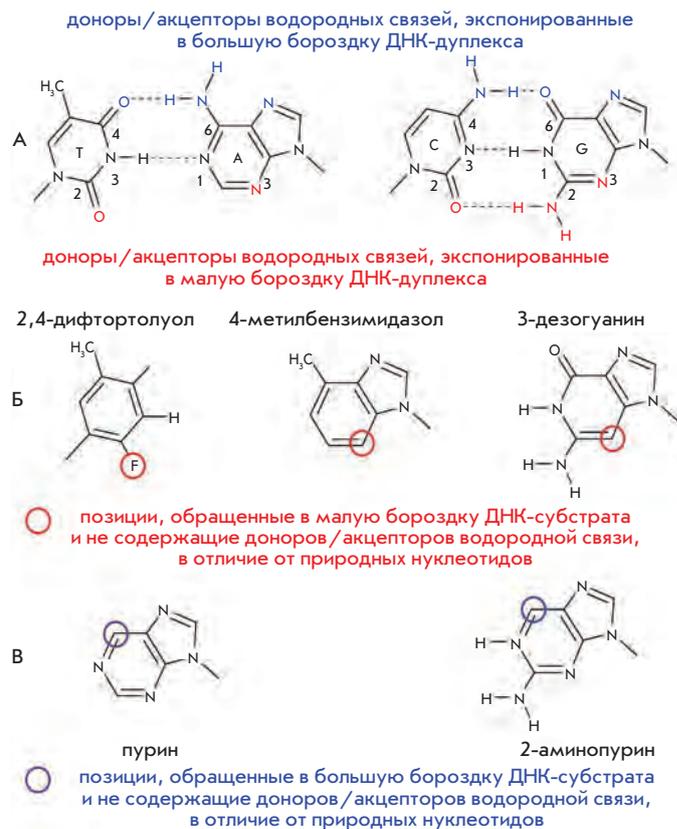


Рис. 10. Расположение доноров/акцепторов водородных связей в малой и большой бороздках уотсон-криковских пар оснований (А). Модифицированные основания, не содержащие доноров/акцепторов водородной связи в соответствующих позициях в малой (Б) или большой (В) бороздках спирали дцДНК. Синим и красным обозначены атомы – доноры/акцепторы водородных связей, обращенные в большую и малую бороздки соответственно

к снижению эффективности фермент-субстратного взаимодействия в случае комплементарного комплекса и практически не меняла процессирование субстрата с 3'-мисматчем [76, 78, 79]. Замена Q849A не влияла на распознавание ферментом ДНК-субстрата [78]. Таким образом, на примере использования мутантных форм ДНК-полимераз была подтверждена важность реализации контактов в малой бороздке как фактора, определяющего эффективное процессирование субстрата, при этом, как и в случае модифицированных аналогов нуклеотидов, была показана необходимость формирования водородных связей в малой бороздке ДНК со стороны удлиняемой цепи.

Существуют данные, что для эффективной ферментативной реакции не важна природа заместителей, обращенных в сторону большой бороздки ДНК-субстрата и находящихся, например, в шестом положении гетероциклических оснований. В качестве подобных аналогов нуклеотидов были рассмотрены 2-аминопури́н и пури́н, образующие пару с урацилом (рис. 10, В) [73]. Наличие модифицированных оснований в -1 или +1 положении от ника не приводило к значительному снижению эффективности ферментативной реакции, проводимой с помощью *Tth* или T4 ДНК-лигаз [73].

В ряде случаев для эффективного протекания ферментативной реакции реализация контактов в малой бороздке может быть менее принципиальна, чем некоторые другие взаимодействия. Данные получены при исследовании мутантных форм ДНК-полимераз семейства А (*Taq*, фрагмент Кленова) по консервативному мотиву Gln-Val-His (QVH), входящему в состав мотива С [43, 80]. Известно, что данный мотив взаимодействует с дезоксирибозой 3'-концевого нуклеотида праймера, при этом остаток гистидина может быть включен в образование водородной связи с малой бороздкой дуплекса. Были получены мутанты ДНК-полимераз, проявляющие повышенную способность к дискриминации субстратов с мисматчами (в некоторых случаях даже удаленных на 2–4 нуклеотида от сайта ферментативного превращения [80]) по сравнению с ферментами дикого типа. Из них наиболее селективными оказались мутанты PLQ, LVG, LVL для фрагмента Кленова, ILL, IVF, CLV для *Taq* полимеразы. Из всех полученных мутантов только PLQ содержал глутамин вместо гистидина, имидазольное кольцо которого могло выступать в качестве донора электронов. В большинстве случаев гистидиновый остаток был замещен аминокислотами с неполярными боковыми радикалами (лейцин, валин, глицин, фенилаланин) [80]. Можно предположить, что в данном случае более важным оказывается реализация гидрофобных взаимодействий, способствующих, в т.ч., стабилизации А-формы дуплекса вблизи сайта ферментативного превращения.

В случае мутантов фрагмента Кленова: N675A, R835L, R836A, R841A и N845A наблюдалось снижение селективности [78]. Причина влияния данных мутаций на точность удлинения ДНК-субстрата не вполне очевидна. Авторы предполагают, что аминокислота N845 может быть ответственна за распознавание «правильности» формы 3'-концевой пары нуклеотидов. Остатки R835, R836, R841, взаимодействуя с одноцепочечным участком матричной цепи, могут способствовать стабилизации изгиба, наблюдаемого в данном фрагменте ДНК. Аминокислота N675 взаимодействует с матрицей в позиции перехода структуры ДНК из В- в А-форму и, следовательно, может отвечать за фиксацию подобного конформационного искажения.

Замены в аминокислотной последовательности ДНК-лигаз также могут приводить к изменению эффективности лигирования субстрата. Так, на примере аналогов ДНК-лигазы *E.coli* с заменами наиболее консервативных аминокислот в ОВ домене: R379A, V383A, I384A и R333A-T334A было показано значительное снижение эффективности лигирования, составившей не более 10 % относительно исходного фермента [69]. Причины изменения эффективности лигирования, определяемые функциями соответствующих аминокислотных остатков, связаны с влиянием на образование водородных связей в малой бороздке со стороны матричной цепи ОН-компонента (аминокислота R379), на взаимодействие с углеводным остовом матричной цепи (R333 и T334), на образование сети Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий с парами оснований вблизи одноцепочечного разрыва (с двумя парами ОН-компонента и одной Р-компонента) для стабилизации ДНК-субстрата в А-форме (V383 и I384) [69]. Для ДНК-лигаз семейства *Thermus* (ТАК16D и АК16D) был выявлен ряд мутантов с повышенной точностью выявления 3'-концевых одиноч-

ных мисматчей: мутантные формы D286E, G287A, V289I, K291R по AdD домену [81] и T599A по домену BRCT [82] соответственно. В случае *Tth* лигазы было обнаружено, что использование мутантов K294R, K294P приводит к повышению селективности реакции [30]. Однако причины, приводящие к подобным результатам, не установлены. Известно, что данные аминокислоты задействованы на разных этапах ферментативной реакции, скорее всего повышение селективности является результатом комплексного эффекта на нескольких стадиях лигирования.

Таким образом, селективность ферментативных реакций во многом определяется реализацией «правильных» контактов в фермент-субстратном комплексе. Вероятнее всего, именно совокупность точечных взаимодействий в данном комплексе обеспечивает выявление несовершенных участков в дцДНК-субстрате.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАЦИЙ, ВОЗМУЩАЮЩИХ СТРУКТУРУ ДНК-СУБСТРАТА, НА СЕЛЕКТИВНОСТЬ ЕГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ

В предыдущей главе нами было рассмотрено строение ДНК-зависимых ферментов и образуемых ими комплексов с субстратами с точки зрения выявления факторов, обеспечивающих селективность ферментативного превращения. В данной главе будет рассмотрено влияние строения субстратного ДНК-комплекса на возможность повышения селективности ферментативной реакции. Одним из наиболее простых способов повышения наблюдаемой селективности ферментативного лигирования, вероятно, является способ, основанный на использовании «модифицированных» зондов – тандемов коротких олигонуклеотидов [83–85]. Наличие среди лигируемых компонентов минизондов, пента- или даже тетра-нуклеотидов делает такие составные комплексы менее эффективными субстратами, селективность ферментативного превращения которых оказывается высокой [83, 85]. Так, в случае использования тетра-нуклеотида в качестве центральной части трехкомпонентного тандема факторы дискриминации практически любых мисматчей, располагаемых в соответствующей зоне субстратного комплекса, оказываются выше 300 при использовании мезофильной Т4 ДНК-лигазы [85]. Столь высокая селективность действия фермента не достигается, если ДНК-дуплекс формируется олигонуклеотидами, длина которых достаточна для оптимального связывания белковой молекулы на субстрате [например, 37].

ВВЕДЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНОГО ОДНОНУКЛЕОТИДНОГО НЕСООТВЕТСТВИЯ

Еще один способ повышения селективности фермент-зависимых реакций, не связанный с использованием модифицированных производных нуклеотидов, основан на использовании ДНК-субстратов с дополнительным, преднамеренно сформированным мисматчем по соседству с анализируемым полиморфным сайтом. Эффективность данного способа была продемонстрирована для реакций с участием *Taq* ДНК-полимеразы [14, 86–90] и *Tth* ДНК-лигазы [30]. В данном методе значимый мисматч располагают на 3'-конце удлиняемого олигонуклеотида или лигируемого ОН-компонента, а дополнительный вводят вблизи

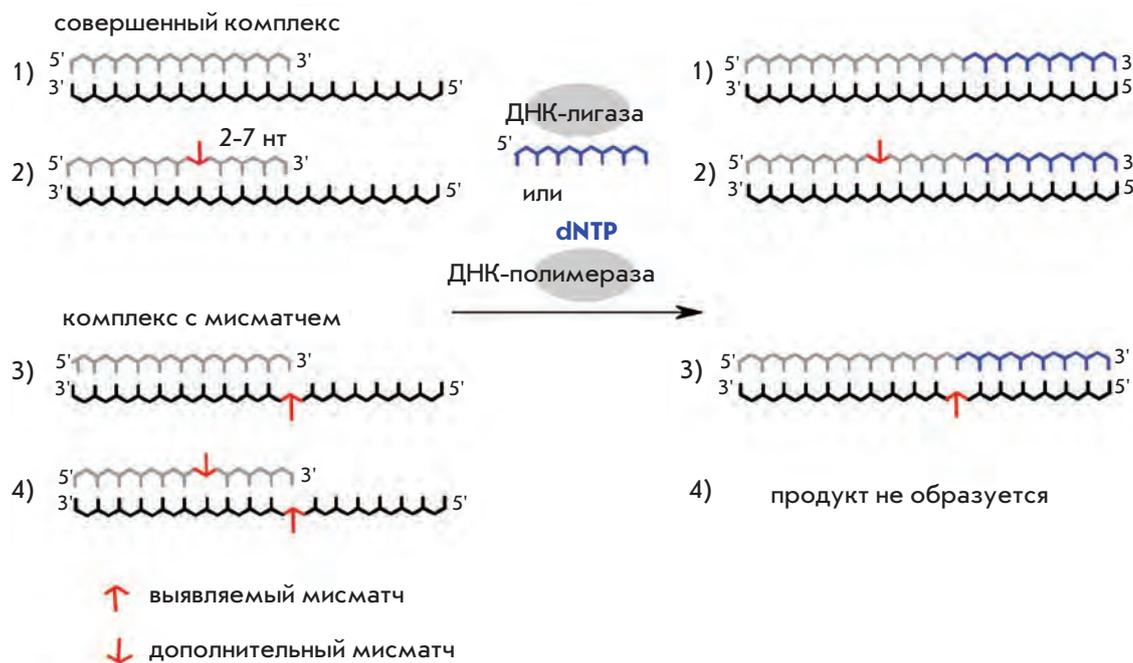


Рис. 11. Схема выявления некомплементарной пары в составе ДНК-субстрата в ходе его ферментативного превращения с использованием дополнительного преднамеренного мисматча

3'-конца, а именно во 2-ю, 3-ю, 4-ю позиции [14, 30, 88–90], а в некоторых случаях в 5-ю и 7-ю [86]. Таким образом, в этих случаях «совершенный» комплекс имеет одиночную преднамеренно введенную некомплементарную пару, а комплекс с выявляемым мисматчем содержит в результате два возмущения (рис. 11).

Сравнение эффективности накопления полноразмерного продукта удлинения или лигирования показало, что единственная некомплементарная пара не приводит к значительному снижению эффективности превращения ДНК-субстрата, а двойной мисматч способен снижать выход конечного продукта в некоторых случаях до 100 и более раз [14, 30, 88]. Исключение наблюдалось только в случае субстратного комплекса с 3'-концевым мисматчем 3'-Т/Н, когда введение второго мисматча в предпоследнюю позицию снижало выход продукта всего в 5–10 раз, а наличие двух расположенных рядом 3'-Т/Н мисматчей снижало выход в 2–5 раз, что слабо отличается от эффективности удлинения совершенного комплекса [14]. Было исследовано влияние позиции преднамеренного нуклеотидного несоответствия на снижение ложно-положительного сигнала при процессировании олигонуклеотидных зондов [14, 30, 86, 88, 90]. Дополнительный мисматч в любой из описанных выше позиций приводил к повышению эффективности дискриминации исходного несоответствия. Однако преднамеренный мисматч во 2-й позиции в ряде экспериментов приводил к сильному снижению эффективности ферментативной реакции. Так, для реакции с участием *Tth* ДНК-лигазы даже в случае комплементарной пары на 3'-конце олигонуклеотида падение эффективности образования продукта происходило в 175 раз [30]. Некомплементарная пара в 4-й позиции, наоборот, в ряде случаев недостаточно повышала селективность [86, 90]. Из всех рассмотренных позиций введения дополнительного мисматча для повы-

шения эффективности выявления значимого мисматча в сайте ферментативного превращения, как в процессе реакции наращивания, так и лигирования, оптимальной оказывалась третья пара нуклеотидов от 3'-конца [30, 88, 90]. Для реакций удлинения было показано, что конечный выход продукта, содержащего некомплементарную пару на 3'-конце, в таком случае не превышает 5 % [90]. Для реакций лигирования при введении внутреннего мисматча точность ферментативной реакции, выражаемая как соотношение начальных скоростей превращения комплекса с комплементарной парой на 3'-конце и комплекса с мисматчем в данной позиции, увеличивалась в 4 раза [30].

Таким образом, дополнительный мисматч, введенный в структуру ДНК-субстрата одновременно со значимой однонуклеотидной заменой, приводит к повышению селективности фермент-зависимых реакций. Наблюдаемые закономерности обусловлены, скорее всего, тем, что два расположенных недалеко друг от друга нуклеотидных несоответствия приводят к более значительному возмущению распознаваемой ферментом части ДНК-комплекса и, следовательно, к большему изменению стабильности и геометрии ДНК-спирали. В результате двойной мисматч относительно одиночного более значительно снижает эффективность ферментативной реакции. Однако введение дополнительных однонуклеотидных мутаций вряд ли можно назвать универсальным способом повышения селективности в силу сиквенс-зависимости подобных «возмущений» структуры ДНК.

МОДИФИКАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ, ПОВЫШАЮЩИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

В настоящее время олигонуклеотиды, содержащие в своем составе модифицированные основания или измененный

углеводно-фосфатный остов, занимают отдельную нишу в дизайне зондов для гибридизационного анализа ДНК. Одни модификации (PNA – пептидилнуклеиновые кислоты [91], LNA и ENA – «замкнутые» нуклеиновые кислоты [92, 93]) повышают стабильность модифицированных комплексов, что используется для увеличения точности ДНК-анализа на уровне образования гибридизационного комплекса. Другие модификации (N4-алкилцитозин [94], 5-метил- или 5-(1-пропаргил)урацил [95]) могут выравнивать гибридизационные свойства комплексов с отличающимся нуклеотидным составом, что важно при параллельном анализе различных последовательностей ДНК. Следует отметить, что не все модификации олигонуклеотидов совместимы с ДНК-зависимыми ферментами, поскольку их введение в структуру ДНК-субстрата может затруднять образование необходимых для эффективного протекания ферментативной реакции белково-нуклеиновых взаимодействий. Тем не менее введение некоторых аналогов нуклеотидов может стать способом повышения селективности выявления мисматчей ферментами в составе модифицированных ДНК-дуплексов (табл. 3).

МОДИФИКАЦИИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ

Одним из примеров используемых модификаций является синтетический аналог дезоксирибонуклеотида, несущий универсальное основание 3-нитропиррол. «Универсальность» такого основания выражается в том, что оно может образовывать пары со всеми природными основаниями, поскольку обладает небольшими размерами, сопоставимыми с размерами природных нуклеотидов, и при этом сохраняет способность вступать в стэкинг-взаимодействия. Было исследовано влияние такого аналога на селективность *Tth* ДНК-лигазы [30] при его введении в третье положение от дискриминируемой пары, расположенной на 3'-конце ОН-компонента. Выбор позиции обусловлен результатами по повышению селективности за счет дополнительного мисматча, для которого было установлено оптимальное расположение в -3 позиции от сайта ферментативного превращения. Наличие нуклеотидного аналога приводило к увеличению селективности лигирования *Tth* ДНК-лигазой в 9 раз, что в 2.5 раза больше, чем в случае повышения селективности за счет введения дополнительного мисматча на основе канонических оснований. Для реакции с участием *Taq* полимеразы также было зафиксировано снижение выхода образования продукта ПЦР в случае одиночного мисматча и праймера, содержащего 3-нитропиррол, относительно нативного праймера [96]. Некоторым недостатком использования универсальных оснований может оказаться затруднительное прогнозирование связывания олигонуклеотидов, содержащих подобные аналоги, на соответствующей ДНК-матрице.

Другим нуклеотидным аналогом, повышающим эффективность дискриминации мисматчей *Tth* ДНК-лигазой, в случае его введения в структуру зонда оказывается 4-нитроимидазол дезоксирибонуклеотид, образующий с гуаниновым основанием пару менее стабильную относительно нативной С/С-пары [97]. Использование модифицированных по крайней мере двумя подобными аналогами зондов позволило снизить соотношение выходов продуктов лиги-

рования комплекса с мисматчем к «правильному» субстрату в среднем на 15 % относительно применения нативных олигонуклеотидов [97].

Действие представленных модификаций основано на том же принципе, что и введение дополнительного мисматча вблизи выявляемого полиморфизма. Введение модификаций приводит к дестабилизации ДНК-дуплекса, которой оказывается достаточно для снижения эффективности ферментативного превращения только в случае наличия в структуре дуплекса анализируемой несовершенной пары нуклеотидов. С другой стороны, в литературе представлены производные – 7-деазагуанин и инозин, снижающие стабильность дуплексов, но не повышающие селективность *Tth* ДНК-лигазы при одновременном введении в структуру ДНК-субстрата с мисматчем [97]. Это, вероятно, может быть обусловлено возникающими в случае данных модификаций стерическими затруднениями.

Таким образом, хотя аналоги нуклеотидов, модифицированные по гетероциклическим основаниям, способны формировать водородные связи с нативными нуклеотидами, очевидно, что образуемые ими связи отличны от уотсон-криковских. Это может оказаться одной из причин возмущения спирали ДНК. Использование в гибридизационном анализе олигонуклеотидов, модифицированных по углеводно-фосфатному остову, может быть более обосновано, поскольку в данном случае не затрагивается часть нуклеотида, ответственная непосредственно за его комплементарное связывание с НК-матрицей.

МОДИФИКАЦИИ УГЛЕВОДНОГО ОСТАТКА

К подобным производным олигонуклеотидам относят олигомеры, содержащие модифицированные бициклические РНК-подобные звенья с 2'-О, 4'-С метиленовыми и 2'-О, 4'-С этиленовыми мостиками – LNA (Locked Nucleic Acid) [98–102] и ENA (Ethylene Nucleic Acid) [103] соответственно.

Для LNA- и ENA-содержащих олигонуклеотидов показано их повышенное родство к комплементарной НК-матрице, это свойство используется для выявления мисматчей при проведении ПЦР за счет повышенной специфичности их комплексообразования [93]. Праймеры с одиночной LNA-модификацией непосредственно на 3'-конце или в предпоследней позиции или несущие ENA-аналог в третьем положении не только не снижают эффективность удлинения *Taq* ДНК-полимеразой модифицированных праймеров в случае совершенного ДНК-субстрата, но и способствуют дискриминации 3'-концевых мисматчей при формировании несовершенного ДНК-комплекса [98–103]. Так, включение модификаций в 3'-концевую область олигонуклеотида снижает выход продукта ПЦР при наличии «трудновыявляемых» мисматчей (С/А, Т/С, С/Т), по крайней мере, на 50 % относительно случая использования нативного праймера [98, 99, 103]. Причина такого редактирования селективности олигонуклеотидами с бициклическими аналогами может быть связана с изменением поведения модифицированного ДНК-субстрата в активном центре фермента. Наличие замкнутого «мостика» приводит к закреплению рибозы нуклеотида в 3'-эндоконформации [104], свойственной нуклеотидам дцДНК-спирали в А-форме. Кроме того, изначально пред-

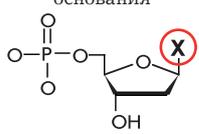
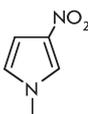
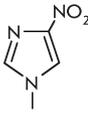
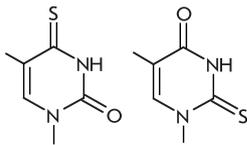
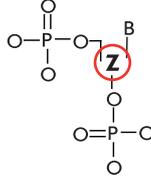
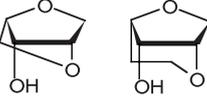
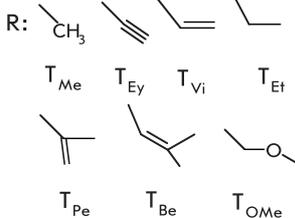
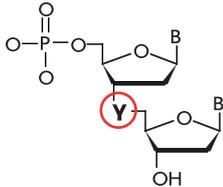
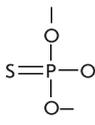
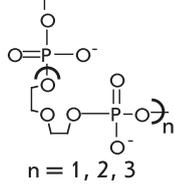
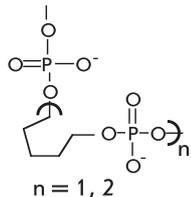
формированный модифицированный нуклеотид оказывается менее конформационно подвижен. Таким образом, LNA- и ENA-модификации способствуют фиксации ДНК-субстрата в А-форме, что благоприятно для реализации контактов белка в малой бороздке ДНК-субстрата.

Еще один тип модификации углеводного остатка в ДНК-зонде, введение которой повышает селективность действия ДНК-полимераз, это С4'-алкилированные тимино-вые нуклеотиды T_R [105–108]. Для данных модификаций, вызывающих появление нетипичных для ДНК-дуплексов группировок в малой бороздке, первоначально была определена эффективность удлинения модифицированного по 3'-концевой позиции олигонуклеотида в зависимости от размеров алкильного остатка и типа используемой ДНК-полимеразы [107]. ДНК-полимераза археи *Thermococcus litoralis* (*Vent*) оказалась способной наращивать модифицированный олигонуклеотид даже при наличии в его составе относительно объемного винильного остатка, тогда как ДНК-полимераза археи *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) может удлинять праймер, несущий только минимальный из рассмотренных метильный заместитель. *Taq* полимеразы оказалась не способна удлинять модифицированные олигонуклеотиды. Авторы предполагают, что потеря способности удлинять праймер, содержащий 3'-концевой нуклеотид с объемным заместителем при С4', связана со стерическими ограничениями и для каждой из полимераз

объясняется размерами и формой ее активного центра [107]. С4'-алкилдезоксиритобимидин повышает дискриминацию 3'-концевого мисматча не только когда является одним из нуклеотидов, образующих несовершенную пару, но и когда образует вторую или третью пару от конца праймера [105]. При этом для зонда с 3'-модифицированным звеном эффективность дискриминации 3'-концевого мисматча возрастает с увеличением размеров заместителя в С4'-положении дезоксирибозы. В частности, для *Vent* полимеразы селективность достройки праймера нарастает в представленном ряду: $T < T_{Me} < T_{Ey} < T_{Vi}$ (структуру см. в табл. 3).

Величина $\Delta\Delta C_t$, равная разнице номера порогового цикла при сопоставлении ПЦР для случаев формирования модифицированным (С4'-этил) праймером совершенного и 3'-мисматч-содержащего комплексов с ДНК, достигает значения 8.5 циклов. В то же время соответствующее значение при использовании немодифицированного праймера близко к нулю [107]. Наблюдаемый эффект повышения селективности ПЦР проявляется и при наличии мисматчей, отстоящих даже на 4 п.н. от сайта превращения [106]. Авторы отмечают, что введение подобных неполярных заместителей в олигонуклеотидные праймеры не приводит к дестабилизации их комплексов с ДНК, и проявляемые при ПЦР особенности не зависят от буферных условий или нуклеотидного состава формируемых дуплексов. Та-

Таблица 3. Модификации олигонуклеотидов, повышающие селективность действия ДНК-зависимых ферментов

модификации гетероциклического основания	модификации углеводного остатка	модификации межнуклеотидного фосфата
 <p>3-нитропиррол [30, 96]</p>  <p>4-нитроимидазол [97]</p>  <p>C2, C4-тиотимидин [109]</p> 	 <p>2'-О, 4'-С метиленирибоза (LNA) [98–102], 2'-О, 4'-С этиленирибоза (ENA) [103]</p>  <p>С4'-алкилрибоза [105–109]</p>  <p>R:</p>  <p>T_{Me} T_{Ey} T_{Vi} T_{Et} T_{Pe} T_{Be} T_{OMe}</p>	 <p>Тиофосфат [110–112]</p>  <p>Олигоэтиленгликоль [13, 113]</p>  <p>$n = 1, 2, 3$</p> <p>Олигометилендиол [13, 113]</p>  <p>$n = 1, 2$</p>

ким образом, наблюдаемые эффекты повышения селективности действия ДНК-полимеразы являются следствием возмущения сети фермент/субстратных взаимодействий, вызванных экспонированными в малую бороздку группировками С4'-заместителей.

В продолжение исследований авторами была использована комбинация модификаций. В состав олигонуклеотидного праймера на его 3'-конец вводили модифицированный тимидин, содержащий 4'-С-метоксиметиленовый остаток в дезоксирибозе в комбинации с тиогруппой в С2 или С4 положении тиминового основания [109]. В реакциях с участием *Vent* ДНК-полимеразы и однотипно модифицированными праймерами повышение эффективности распознавания 3'-концевого мисматча наблюдалось только в случае использования углевод-замещенного олигонуклеотида ($T_{\text{оме}}$, $\Delta C_i = 9$). Наличие тиогруппы в положении С2 основания ($^{2\text{S}}T$) приводило лишь к незначительному возрастанию селективности ПЦР ($^{2\text{S}}T$, $\Delta C_i = 3$), а в С4 – не изменяло ее ($^{4\text{S}}T$, $\Delta C_i \approx 0$). В то же время одновременное присутствие метоксиметиленового остатка и модификации в гетероциклическом основании вызывает кардинальное увеличение дискриминирующей способности ДНК-полимеразы. Наблюдаемые для двояко модифицированных праймеров $^{2\text{S}}T_{\text{оме}}$ и $^{4\text{S}}T_{\text{оме}}$ величины ΔC_i составили 12 и 19 циклов соответственно.

Таким образом, продемонстрировано, что благодаря согласованию различных типов модификаций праймера можно достигнуть значительного повышения селективности действия фермента по отношению к нуклеотидным несоответствиям в ДНК-субстрате. К наиболее вероятным причинам подобных свойств модифицированных ДНК-комплексов можно отнести стерические препятствия, возникающие как в случае заместителя в рибозе, так и дополнительно за счет тиогруппы, влияние которых на протекания ферментативной реакции, по-видимому, особенно драматично в случае нахождения в противоположной цепи напротив нуклеотидного аналога некомплементарного основания. С другой стороны, при формировании фермент-субстратного комплекса для 3'-концевого нуклеотида праймера важна реализация гидрофобных контактов, что обсуждалось в предыдущей главе. Неполарные заместители, вероятно, могут способствовать данным контактам.

МОДИФИКАЦИИ МЕЖНУКЛЕОТИДНОГО ФОСФОДИЭФИРНОГО ОСТАТКА

Повышение селективности действия ДНК-полимераз было показано и при использовании модифицированных по межнуклеотидному фосфодиэфирному остатку олигонуклеотидных праймеров [110–112]. Замена природных фосфатных группировок, расположенных между первым и вторым нуклеозидами от 3'-конца праймера, на тиофосфатные увеличивала способность распознавания *Vent*, *Pfu* ДНК-полимеразами субстрата с 3'-концевым мисматчем [110–112]. Такие модификации не приводят к значительным изменениям стабильности протяженных ДНК-комплексов, и, тем не менее, их наличие повышает дискриминацию даже отдаленных от сайта ферментативного превращения нуклеотидных несоответствий, как одиночных, так и мультиплексных. Удлинения модифицированного олигонуклеотида

ДНК-полимеразами не наблюдалось при наличии мисматчей, удаленных даже на 8 нуклеотидов от 3'-конца праймера [111]. Отметим, что согласно представленным выше данным ДНК-полимеразы вплоть до этого положения праймерной цепи взаимодействуют с ДНК, формируя тесные контакты с углеводно-фосфатным остовом двойной спирали. В то же время авторы отмечают, что для строго обеспечения селективности ферментативной реакции при использовании фосфотиоатных аналогов олигонуклеотидов необходимо выбирать ДНК-полимеразы с экзонуклеазной корректирующей активностью и проводить подбор условий аллель-специфичной ПЦР [112].

Повышенная относительно нативных ДНК-дуплексов эффективность дискриминации одиночных мисматчей в ДНК-субстратах как в ходе ферментативного лигирования с помощью ДНК-лигазы фага T4, так и удлинения *Taq* ДНК-полимеразой была продемонстрирована на примере использования олигонуклеотидных зондов, несущих ненуклеотидные вставки в углеводно-фосфатном остове [13, 113]. Наличие вставок на основе фосфодиэфиров олигоэтиленгликолей и олигометилендиолов внутри сайта связывания фермента на ДНК-субстрате или на его границе приводит к значительному повышению наблюдаемой селективности превращения модифицированного зонда. В комплексах с ненуклеотидным выпетливанием ферменты дискриминируют даже удаленные от сайта ферментативного превращения мисматчи. Факторы дискриминации мисматча, удаленного от сайта превращения на шесть нуклеотидов, при использовании зондов на основе олигонуклеотида со вставкой в шестом положении достигают 8 при лигировании и 12 при его удлинении. Использование в аналогичном комплексе нативного зонда не обеспечивает надежной дискриминации однонуклеотидного несоответствия в матричной цепи – факторы дискриминации мисматча при лигировании и при полимеризации составляют 2.9 и 1.2 соответственно [13].

Авторы отмечают, что наличие ненуклеотидного выпетливания в составе субстратных дуплексов является своего рода возмущением структуры субстрата, которое в любом случае препятствует ферментативному катализу, однако присутствие дополнительного возмущения в виде мисматча значительно повышает вероятность его дискриминации, что и обуславливает наблюдаемое повышение селективности аллель-специфичной ферментативной реакции.

Таким образом, введение «возмущающих» элементов в структуру ДНК-субстрата ферментативных реакций в некоторых случаях может способствовать достижению желаемой достоверности распознавания нуклеотидных несоответствий в его составе. Искусственно сформированные особенности строения ДНК-комплекса могут приводить к повышению селективности ДНК-лигаз и ДНК-полимераз, однако часто наблюдаемый эффект происходит на уровне общего снижения эффективности ферментативного превращения. Можно предполагать, что наиболее эффективным способом повышения селективности окажется использование модификаций, которые будут влиять на точность ферментативной реакции на уровне стабилизации реакционного комплекса в правильной конформации и способствовать реализации необходимых фермент-субстратных взаимодействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные, представленные в обзоре, доказывают, что проблема обеспечения высокой селективности ферментативных превращений олигонуклеотидных зондов при проведении анализа нуклеотидных полиморфизмов в ДНК является многопараметрической. Можно утверждать, что универсальная схема анализа, обеспечивающая однозначную дискриминацию любых нуклеотидных вариаций в ДНК с помощью представленных аналитических подходов, до сих пор не разработана. При выборе схемы анализа ДНК необходимо проводить комплексный дизайн компонентов аналитической системы, учитывающий «две стороны одной медали» – во-первых, особенности распознавания субстратных комплексов ДНК-процессирующим ферментом и, во-вторых, непосредственно факторы структуры ДНК-субстрата, формируемого с помощью молекулярного зонда на основе олигонуклеотида или его производного. В обзоре систематизированы наиболее показательные факты, характеризующие специфику анализа нуклеотид-

ных полиморфизмов в ДНК с использованием ДНК-лигаз и ДНК-полимераз. Представленные данные отражают фундаментальные принципы обеспечения селективности превращений олигонуклеотидных зондов при анализе ДНК с помощью данных ферментов и указывают на наиболее перспективные разработки в этом направлении, имеющиеся к настоящему моменту. Проведенный анализ показывает, что, несмотря на значительное число работ, рассмотренных в данном обзоре, проблема обеспечения селективности превращения зондов в ходе ферментативных реакций является недостаточно изученной и необходимость ее дальнейшего исследования представляется неоспоримой. ●

*Авторы выражают благодарность Пышной И.А. за помощь при подготовке обзора.
Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», СО РАН (интеграционные гранты № 76 и 39) и РФФИ (гранты № 08-04-12041, 10-04-01492-а).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rocha D., Gut I., Jeffreys A.J., et al. // Hum. Genet. 2006. V. 119. № 4. P. 451–456.
- Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., et al. // Nucleic Acids Res. 1989. V. 17. № 7. P. 2503–2516.
- Huang M.M., Arnheim N., Goodman M.F. // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20. № 17. P. 4567–4573.
- Wu D.Y., Wallace R.B. // Genomics. 1989. V. 4. № 4. P. 560–569.
- Barany F. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1991. V. 88. № 1. P. 189–193.
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A., Sommer S.S. // Genome Res. 1997. V. 7. № 4. P. 389–398.
- Chen X., Zehnbauser B., Gnirke A., Kwok P.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. V. 94. № 20. P. 10756–10761.
- Hu Y.W., Balaskas E., Kessler G., et al. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 21. P. 5013–5015.
- Пышный Д.В., Скобельцына Л.М., Гущина Е.Н. и др. // Молекуляр. биология. 2000. Т. 34. № 6. С. 984–997.
- Deng J.Y., Zhang X.E., Mang Y., et al. // Biosens. Bioelectron. 2004. V. 19. № 10. P. 1277–1283.
- Virigoswami A., Jung C., Mun H.Y., Park H.G. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2008. V. 70. № 6. P. 897–902.
- Abravaya K., Carrino J.J., Muldoon S., Lee H.H. // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. № 4. P. 675–682.
- Пышная И.А., Виноградова О.А., Кабилов М.Р., Иванова Е.М., Пышный Д.В. // Биохимия. 2009. Т. 74. № 9. С. 1238–1251.
- Kwok S., Kellogg D.E., McKinney N., et al. // Nucleic Acids Res. 1990. V. 18. № 4. P. 999–1005.
- Ayyadevara S., Thaden A.A., Reis R.J.S. // Anal. Biochem. 2000. V. 284. № 1. P. 11–18.
- Thweatt R., Goldstein S., Reis R.J.S. // Anal. Biochem. 1990. V. 190. № 2. P. 314–316.
- Suss B., Flekna G., Wagner M., Hein I. // J. Microbiol. Methods. 2009. V. 76. № 3. P. 316–319.
- Liang P., Pardee B.A. // Science. 1992. V. 257. № 5072. P. 967–971.
- Christopherson C., Sninsky J., Kwok S. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 3. P. 654–658.
- Bru D., Martin-Laurent F., Philippot L. // Appl. Environ. Microbiol. 2008. V. 74. № 5. P. 1660–1663.
- Day J.P., Bergstrom D., Hammer R.P., Barany F. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. № 8. P. 1810–1818.
- Petruska J., Goodman M.F., Boosalis M.S., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988. V. 85. № 17. P. 6252–6256.
- Mendelman L.V., Petruska J., Goodman M.F. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 4. P. 2338–2346.
- Tong J., Cao W., Barany F. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. № 3. P. 788–794.
- Pritchard C.E., Southern E.M. // Nucleic Acids Res. 1997. V. 25. № 17. P. 3403–3407.
- Housby J.N., Southern E.M. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 18. P. 4259–4266.
- James K.D., Boles A.R., Henckel D., Ellington A.D. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 22. P. 5203–5211.
- Harada K., Orgel L. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. № 10. P. 2287–2291.
- Sriskanda V., Shuman S. // Nucleic Acids Res. 1998. V. 26. № 15. P. 3536–3541.
- Luo J., Bergstrom D.E., Barany F. // Nucleic Acids Res. 1996. V. 24. № 14. P. 3071–3078.
- Nakatani M., Ezaki S., Atomi H., Imanaka T. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. № 2. P. 650–656.
- Wu D.Y., Wallace R.B. // Gene. 1989. V. 76. № 2. P. 245–254.
- Bhagwat A.S., Sanderson R.J., Lindahl T.S. // Nucleic Acids Res. 1999. V. 27. № 27. P. 4028–4033.
- Shuman S. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 49. P. 16138–16147.
- Lamarche B.J., Showalter A.K., Tsai M.D. // Biochemistry. 2005. V. 44. № 23. P. 8408–8417.
- Alexander R.C., Johnson A.K., Thorpe J.A., Gevedon T., Testa S.M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. № 12. P. 3208–3216.
- Aoi Y., Yoshinobu T., Tanizawa K., Kinoshita K., Iwasaki H. // BioSystems. 1999. V. 52. № 1–3. P. 181–187.
- Steitz T.A. // Curr. Opin. Struct. Biol. 1993. V. 3. № 1. P. 31–38.
- Delarue M., Poch O., Tordo N., Moras D., Argos P. // Protein Eng. 1990. V. 3. № 6. P. 461–467.
- Loh E., Loeb L.A. // DNA Repair. 2005. V. 4. № 12. P. 1390–1398.
- Kim Y., Eom S.H., Wang J., et al. // Nature. V. 376. № 6541. P. 612–616.
- Strerath M., Gloeckner C., Liu D., Schnur A., Marx A. // ChemBiochem. 2007. V. 8. № 4. P. 395–401.
- Subramanya H.S., Doherty A.J., Ashford S.R., Wigley D.B. // Cell. 1996. V. 85. № 4. P. 607–615.
- Doherty A.J., Suh S.W. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. № 21. P. 4051–4058.
- Shuman S. // Structure. 1996. V. 4. № 6. P. 653–656.
- Martin I.A., MacNeill S.A. // Genome Biol. 2002. V. 3. № 4. P. 1–7.
- Pascal J.M., O'Brien P.J., Tomkinson A.E., Ellenberger T. // Nature. 2004. V. 432. № 7016. P. 473–478.
- Cherepanov A.V., de Vries S. // Eur. J. Biochem. 2002. V. 269. № 24. P. 5993–5999.
- Doublet S., Tabor S., Long A.M., Richardson C.C., Ellenberger T. // Nature. 1998. V. 391. № 6664. P. 251–258.
- Franklin M.C., Wang J., Steitz T.A. // Cell. 2001. V. 105. № 5. P. 657–667.
- Li Y., Korolev S., Waksman G. // EMBO J. 1998. V. 17. № 24. P. 7514–7525.
- Kiefer J.R., Mao C., Braman J.C., Beese L.S. // Nature. 1998. V. 391. № 6664. P. 304–307.
- Drew H.R., Wing R.M., Takano T., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1981. V. 78. № 4. P. 2179–2183.
- Odell M., Sriskanda V., Shuman S., Nikolov D.B. // Mol. Cell. 2000. V. 6. № 5. P. 1183–1193.
- Johnson A., O'Donnell M. // Curr. Biol. 2005. V. 15. № 3. P. R90–R92.
- Nandakumar J., Nair P.A., Shuman S. // Mol. Cell. 2007. V. 26. № 2. P. 257–271.
- Nair P.A., Nandakumar J., Smith P., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2007. V. 14. № 8. P. 770–778.
- Lu X.J., Shakked Z., Olson W.K. // J. Mol. Biol. 2000. V. 300. № 4. P. 819–840.
- Seeman N.C., Rosenberg J.M., Rich A. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1976. V. 73. № 3. P. 804–808.
- Kunkel T.A., Bebenek K. // Annu. Rev. Biochem. 2000. V. 69. P. 497–529.
- Eom S.H., Wang J., Steitz T.A. // Nature. 1996. V. 382. P. 278–281.
- Hendrickson C.L., Devine K.G., Benner S.A. // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. № 7. P. 2241–2250.
- Polesky A.H., Steitz T.A., Grindley N.D.F., Joyce C.M. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 24. P. 14579–14591.
- Polesky A.H., Dahlberg M.E., Benkovic S.J., Grindley N.D.F., Joyce C.M. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 12. P. 8417–8428.
- Braithwaite D.K., Ito J. // Nucleic Acids Res. 1993. V. 21. № 4. P. 787–802.

66. Doherty A.J., Dafforn T.R. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 296. № 1. P. 43–56.
67. Odell M., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 20. P. 14032–14039.
68. Ng P., Bergstrom D.E. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 13. P. e107.
69. Wang L.K., Nair P.A., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 34. P. 23343–23352.
70. Wang L.K., Zhu H., Shuman S. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 13. P. 8486–8494.
71. Doherty A.J., Serpell L.C., Ponting C.P. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. № 13. P. 2488–2497.
72. Shao X., Grishin N.V. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 14. P. 2643–2650.
73. Liu P., Burdzy A., Sowers L.C. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 15. P. 4503–4511.
74. Perrino F.W., Preston B.D., Sandell L.L., Loeb L.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989. V. 86. № 21. P. 8343–8347.
75. McCain M.D., Meyer A.S., Schultz S.S., Glekas A., Spratt T.E. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 15. P. 5647–5659.
76. Spratt T.E. // *Biochemistry.* 2001. V. 40. № 9. P. 2647–2652.
77. Morales J.C., Kool E.T. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. № 42. P. 12979–12988.
78. Thompson E.H., Bailey M.F., van der Schans E.J., Joyce C.M., Millar D.P. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 3. P. 713–722.
79. Minnick D.T., Bebenek K., Osheroff W.P., et al. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 5. P. 3067–3075.
80. Summerer D., Rudinger N.Z., Detmer I., Marx A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. № 30. P. 4712–4715.
81. Feng H. // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007. V. 39. № 8. P. 608–616.
82. Feng H., Parker J.M., Lu J., Cao W. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. № 39. P. 12648–12659.
83. Broude N.E., Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994. V. 91. P. 3072–3076.
84. Dubiley S., Kirillov E., Lysov Yu., Mirzabekov A. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 12. P. 2259–2265.
85. Пышный Д.В., Кривенко А.А., Лохов С.Г. и др. // *Биоорганическая химия.* 1998. Т. 24. № 1. С. 32–37.
86. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., et al. // *Nucleic Acids Res.* 1989. V. 17. № 7. P. 2503–2516.
87. Cha R.S., Zarbl H., Keohavong P., Thilly W.G. // *PCR Methods Appl.* 1992. V. 2. № 1. P. 14–20.
88. Rust S., Funke H., Assmann G. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. № 16. P. 3623–3629.
89. Зыкова Е.С., Патрушев Л.И., Каюшин А.И. и др. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. № 3. С. 205–210.
90. Zhou G.H., Kamahori M., Okano K., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. № 19. P. e93.
91. Nielsen P.E. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001. V. 12. № 1. P. 16–20.
92. Koshkin A.A., Singh S.K., Nielsen P., et al. // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. № 14. P. 3607–3630.
93. Orum H., Jakobsen M.H., Koch T., Vuust J., Borre M.B. // *Clin. Chem.* 1999. V. 45. № 11. P. 1898–1905.
94. Nguyen H.K., Fournier O., Asseline U., Dupret D., Thuong N.T. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 6. P. 1492–1498.
95. Hacia J.G., Woski S.A., Fidanza J., et al. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 21. P. 4975–4982.
96. Guo Z., Liu Q., Smith L.M. // *Nat. Biotechnol.* 1997. V. 15. № 4. P. 331–335.
97. Zirvi M., Bergstrom D.E., Saurage A.S., Hammer R.P., Barany F. // *Nucleic Acids Res.* 1999. V. 27. № 24. P. e41.
98. Latorra D., Campbell K., Wolter A., Hurley J.M. // *Hum. Mutat.* 2003. V. 22. № 1. P. 79–85.
99. Giusto D.A.D., King G.C. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 3. P. e32.
100. Kennedy B., Arar K., Reja V., Henry R.J. // *Anal. Biochem.* 2006. V. 348. № 2. P. 294–299.
101. Ballantyne K.N., van Oorschot R.A.H., Mitchell R.J. // *Genomics.* 2008. V. 91. № 3. P. 301–305.
102. Strand H., Ingebretsen O.C., Nilssen O. // *Clin. Chim. Acta.* 2008. V. 390. № 1–2. P. 126–133.
103. Koizumi M., Morita K., Takagi M., Yasumo H., Kasuya A. // *Anal. Biochem.* 2005. V. 340. № 2. P. 287–294.
104. Petersen M., Nielsen C.B., Nielsen K.E., et al. // *J. Mol. Recognit.* 2000. V. 13. № 1. P. 44–53.
105. Summerer D., Marx A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 6. P. 910–911.
106. Tews B., Wilhelm J., Summerer D., et al. // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 10–11. P. 1533–1541.
107. Strerath M., Gaster J., Marx A. // *Chembiochem.* 2004. V. 5. № 11. P. 1585–1588.
108. Strerath M., Gaster J., Summerer D., Marx A. // *Chembiochem.* 2004. V. 5. № 3. P. 333–339.
109. Kranaster R., Marx A. // *Chemistry.* 2007. V. 13. № 21. P. 6115–6122.
110. Zhang J., Li K. // *Mol. Biotechnol.* 2003. V. 25. № 3. P. 223–227.
111. Yanga H.L., Jiang H.J., Fang W.Y., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 328. № 1. P. 265–272.
112. Hu Y.J., Li Z.F., Diamond A.M. // *Anal. Biochem.* 2007. V. 369. № 1. P. 54–59.
113. Пышный Д.В., Иванова Е.М., Пышная И.А., Зарыгова В.Ф. Патент РФ № 2259402 от 27.08.2005.